

Doktori értekezés

A csontok ásványtani vizsgálata

Dallos Zsolt

Témavezető: Dr. Dódony István, egyetemi tanár, D.Sc.



Eötvös Loránd Tudományegyetem

Földtudományi Doktori Iskola Földtan-Geofizika Program

Doktori iskola vezetője: Dr. Bartholy Judit, egyetemi tanár, D.Sc.

Doktori program vezetője: Dr. Harangi Szabolcs, egyetemi tanár,
MTA lev. tag.

2020

“Homo mensura.”
- Protagorasz

Tartalomjegyzék

Jelölések:	4
Rövidítések:	5
Bevezetés	6
A csontok vizsgálatának kutatástörténete	7
Apatit	10
Bioanyagok kutatása	15
Alkalmazott vizsgálati módszerek	19
Röntgen pordiffrakció (XRPD)	20
Rietveld-szerkezetfinomítás	21
Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)	23
Szelektált területű elektrondiffrakció (SAED)	23
Szerkezetépítés, Diffrakciós szimuláció	25
Eredmények	27
Régészeti daganatos betegségben átalakult csontminták	27
Áztatásos kísérlet	33
Hőkezelés	41
Szimulációs eredmények	52
Összefoglalás – tézisek formájában	61
Köszönetnyilvánítás	63
Tartalmi kivonat	64
Abstract	65
Hivatkozott irodalom	66

Jelölések:

a,b,c: az elemi cella egységvektorai

a,b,c: rácsállandók

hkl: hkl Miller-index, reciprokrácsvektor

hkl: reciprokrácspon

x,y,z: rácspont hely koordinátái

f_j: atomi szórástényező

j: j-edik atom az elemi cellában

F_{hkl}: szerkezeti tényező, stuktúrfaktor

N: atomok száma az elemi cellában

λ: hullámhossz

I_{hkl}: hkl reflexió intenzitása

L_{hkl}: Lorentz-polarizációs faktor

φ: műszerprofil

P_{hkl}: kitüntetett orientáció hkl reflexióban

A: tömegabszorpció

A: amplitúdó

Y_{obi}: i-ik pont mért intenzitása

Y_{calci}: i-ik pont számolt intenzitása

Y_{bi}: i-ik pont háttérszórása

Rövidítések:

HAp – hidroxilapatit

CHAp – karbonát-hidroxilapatit

FAp – fluorapatit

ClAp – klórapatit

α -TCP – α -trikalcium foszfát

ED – elektrondiffrakció (*electron diffraction*)

EDX – energiadiszperzív röntgen spektrometria (*energy dispersive X-ray spectrometry*)

FFT– gyors Fourier transzformáció

IFFT– inverz gyors Fourier transzformáció

hcp – hexagonális tömött illeszkedés

IMA – Nemzetközi Ásványtani Társulat (*International Mineralogical Association*)

ITC – Nemzetközi Kristálytani Táblázatok (*International Tables for Crystallography*)

PDF– páreloszlás-függvény (*pair distribution function*)

SAED – szelektált területű elektrondiffrakció (*selected area electron diffraction*)

TEM – transzmissziós elektron mikroszkópia (*transmission electron microscopy*)

HRTEM – nagyfelbontású elektronmikroszkópia (*high resolution transmission electron microscopy*)

XRPD – röntgen-pordiffrakció (*X-ray powder diffraction*)

Bevezetés

A csontok vizsgálata a biológiának, ásványtannak, geológiának, anyagtudománynak és orvostudománynak egyaránt határterülete. Számos kutatási irány köthető több fontos, a csontokhoz kapcsolódó témakörhöz. Biológiában a csontképződés folyamatának a megértése, geológiában a fosszilizáció folyamata, anyagtudományban a csontpótló anyagok fejlesztése, orvostudomány területén pedig a csontbetegségek hatékony kezelése, megelőzése. Krisztallográfiai-ásványtani szempontból a csontok szervetlen alkotórészének a jellemzése, szerkezetmeghatározása az egyik legnagyobb kihívás. Dolgozatomban különböző régészeti és recens, emberi és állati, egészséges és beteg csontokon végeztem ásványtani vizsgálatokat.

Az első és második fejezetek témája a *Kutatástörténet* és az *Alkalmazott vizsgálati módszerek* bemutatása. A kutatástörténet ismertetése során vázlatos képet mutatok arról, hogyan fejlődött a csontok ásványtani vizsgálata napjainkig. Munkámban röntgenpordiffrakciós (XRPD) és transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) módszerekkel vizsgáltam:

- daganatos betegségben átalakult csontmintákat,
- marhacsont átalakulását karbonátos oldatokban, illetve
- 1100 °C-ig hőkezelt marha csontmintákat.

A kísérleti felvételeket, az értékelés során, szimulált diffrakciós felvételekkel vettem össze, vizsgálva a kémiai helyettesítés és méretváltozás okozta hatások változását a diffrakciós adatokban.

A kísérleti munkámhoz kapcsolódóan röviden tárgyalom: Milyen ásványok jellemzik az egészséges és a beteg csontokat? Hogyan mérem azokat? Mi a különbség a hidroxilapatit (HAp) és a bioapatit között? A csont milyen fizikai-kémiai tulajdonságai figyelhetők meg karbonátos közegben, illetve a hőkezelés milyen különbségeket eredményez a csont és a szintetikus HAp között?

A csontok ásványtani vizsgálatára, krisztallográfiai jellemzésére minden érintett tudományterület nagy érdeklődéssel tekint. Mára elérhetővé váltak a szubmikrométeres és szubnanométeres felbontást feltáró vizsgálati módszerek, melyek között az XRPD és a TEM élenjárónak bizonyult. Az XRPD és a TEM egymást kiegészítő technikák, melyek kombinációja igen hatékonyan alkalmazható szerkezetvizsgálatban.

Diffrakciós módszerek használatakor a kristály(ok) vizsgált térfogatára átlagolt reciprokrácsot mérhetünk, és abból számolhatjuk ki az átlagolt kristályrácsot. Azaz a periodikus tulajdonságokat jelemezük. Az aperiodikus tulajdonságok jellemzése kísérleti úton nanométeres kristályok esetén nehézkes, leginkább szimulált diffrakciós adatok segítségével lehetséges.

Dolgozatomban három különböző eredetű csontmintákat vizsgáltam:

- 1, régészeti, daganatos betegségben elváltozott emberi csontleleteket
- 2, karbonátos közegben áztatott marhacsontot.
- 3, hőkezeléseken átesett marhacsontot.

A kísérletek eredményeit külön, az **Eredmények** fejezetben tárgyalom. Az áztatásos kísérlet során karbonátos vízben áztattam porított marhacsontot, változtatva az áztatás idejét és a minta mennyiségét. Hőkezelés során 1100 °C-ig hevítettem porított marhacsontot.

A csontok vizsgálatának kutatástörténete

Napjainkig sem tisztázott kimerítően a csontokat alkotó ásványok szerkezete és kémiai összetétele. Számos publikáció témája – többek között – a csontok szöveti leírása, a krisztályszemcsék habitusának jellemzése, mineralizációs folyamatok megismerése. Széles körben elfogadott közelítő nézet, hogy a csontok hidroxilapatitból (HAp, $\text{Ca}_5[(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$) épülnek fel [1]. Fontos azonban megemlíteni, hogy a csontok anyagvizsgálati kutatásában – vélhetően a téma multidiszciplináris jellegéből adódóan – ezidáig nem alakult ki egységes nomenklátúra. Ebből kifolyólag a csontokkal kapcsolatos kutatások igen széles körűek és szerteágazók. Ásványtani, krisztallográfiai szempontból a csontokat felépítő krisztallitok szerkezetmeghatározása az egyik legaktuálisabb kérdéskör. A meghatározás szükségszerűsége nemcsak az ásványtan, hanem a biológia, anyag és orvostudományok körében is érezhető. A szerkezetmeghatározás eredménye számos új lehetőséget nyújtana az alkalmazott tudományok területén (csontprotézisek készítése, csontbetegségek kezelésének lehetősége), és magyarázattal szolgálna több csontásványokat érintő kérdésre (képződéssel, növekedéssel, idő és térbeli tulajdonságok változásával kapcsolatban).

A csontok, szöveti felépítésüket tekintve csontsejtekből (osteocyták), csontképző sejtekből (osteoblastok) és csontfaló sejtekből (osteoclastok), valamint a csontképző sejtek által termelt sejten kívüli, szerves és szervetlen állományból (extracelluláris mátrix) állnak. A csontképző sejtek felelősek úgy a mátrix szerves anyagának, mint a szervetlen állományának az előállításáért. Elsőként a sejten kívüli szerves állományt választják ki, aminek 90%-a I-típusú kollagén, ami később fibrillumokká rendeződik. Ezután a csontképző sejtek apatit krisztallitokat választanak ki, melyek a kollagén fibrillumokba és a kollagén rostok közötti térbe épülhetnek be, a kristályosodási gócot kialakító, Ca-kötő osteonectin (glikoprotein) enzim segítségével. A csontok ásványtani értelemben vett mineralizációs folyamata azonban részleteiben még ma sem ismert [2], [3], [4].

Csonttal foglalkozó ásványtani cikkek az 1950-es évektől folyamatosan jelennek meg. Posner és munkatársai [5],[6],[7],[8],[9],[10],[11] az elsők között vizsgáltak csontokat és állaptották meg, hogy a csontásványok szerkezete az apatit-csoport tagjaihoz hasonló, arra mint bioapatit hivatkoztak. Ezt az elnevezést használok a dolgozatomban. Megállapításaikat XRPD mérésekre alapozták. Számos esetben állítottak elő egyéb, szintetikus apatit szerkezetet, a kémiai helyettesítés szerkezetre gyakorolt hatásait vizsgálva [12]–[17].

Nem csupán a csontokban található bioapatit. A csont nanométeres, táblás krisztallitjai (20-50 nm hosszúak és 10-20 nm szélesek, a táblák vastagsága 5-10 nm) mellett a fogak dentinjében hasonló méretű, míg a fogzománcban akár 10x-100x nagyobb krisztallitok fordulnak elő [18], [19]–[22]. Biológiában különbséget tesznek a mineralizált (például csont), és hipermineralizált (fog) szövetek között. A csontokat általában 55-60 wt% szervetlen, 30 wt% szerves és 10-15 wt% víz összetevők alkotják, míg a fogzománcokban 94-96 wt% szervetlen és 4-6 wt% szerves anyag ez az arány. A csontok szervetlen anyagtartalma azonban igen széles skálán változhat, függ az élőlény fajtától, életmódjától, csontpatológiai elváltozásaitól [23]. Így a csontokban előforduló bioapatit megjelenése és tulajdonságai is változatosak.

Az apatit szerkezet igen flexibilis, elemhelyettesítés minden kristálytani pozícióban lehetséges. A bioapatit sem kivétel, kémiai összetétele kísérleti okok miatt egyértelműen nem határozható meg. A bioapatitra jellemző helyettesítések közül a CO_3^{2-} helyettesítés a leggyakoribb, amely két szerkezeti pozícióban is helyettesíthet (lásd **Apatit** fejezetben). A kémiai helyettesítés is meghatározza a krisztallitok méretét és alakját. A CO_3^{2-} tartalmú apatit fizikai-kémiai tulajdonságai is megváltoznak, így például

könnyebben oldható, mint a CO_3^{2-} mentes apatit. A bioapatit általános képletét az alábbi formulával írható le [24], [25], [26], [27]:



A PO_4^{3-} – CO_3^{2-} helyettesítés a töltésegyensúly megtartása miatt Ca- Na helyettesítéssel párosulhat. Az apatitszerkezetbe beépülő CO_3^{2-} mennyiségét – legtöbbször – a Ca/P arányból számolják. HAp esetén a Ca/P arány 1,67, míg csontokban ez az érték 1,50 - 2,00 között változik [18], [24], [28], [29].

A krisztallitok méretének és rendeződésének fontosságát a csontok mechanikai tulajdonságai tekintetében egyre több szerző hangsúlyozza. A szerkezet és funkció közötti összefüggésről nanométeres skálán még hiányosak az ismereteink. Ennek egyik oka, hogy a bioapatit nanokristályos formában jelenik meg, szerves mátrixban, így szöveti vizsgálata analitikai nehézségekbe ütközik. A krisztallitok méretéről, rendeződéséről, szövetéről a korai röntgendiffrakciós Wenk munkát [30] követően egyre több TEM és HRTEM (nagyfelbontású elektronmikroszkópia) munka született [31]. A krisztallitok sugárérzékenysége, a nanokristályos megjelenés, az elemhelyettesítések mérésének pontatlansága és a szerves mátrix jelenlétéből kifolyólag a bioapatit szerkezetét meghatározó munka ezeddig nem született.

Apatit

Az apatit megnevezést először Abraham Gerhard (1786) használta, Ca-foszfát ásvány leírására. Az apatit szó görög eredetű, jelentése: megtévesztő, az elnevezés oka, hogy könnyen összetéveszthető más ásványokkal. Azóta már az apatit, mint a leggyakrabban előforduló foszfát ásvány ismeretes. 1856 óta három apatit fajt különítették el: HAp (hidroxilapatit), FAp (fluorapatit) és ClAp (klórapatit). 2008 óta azonban ezeknek az ásványfajoknak a Nemzetközi Ásványtani Társulat, Új Ásvány, Nevezéktani és Osztályozási Bizottság (IMA Commission on New Minerals, Nomenclature and Classification) javaslata alapján a apatit-CaOH, apatit-CaF és apatit-CaCl a megnevezésük [32] (1. táblázat).

1. táblázat Az apatit-csoport ásványai és képletük

<i>Apatit-csoport</i>		
Jelenlegi megnevezés	Korábbi megnevezés	Képlet
Apatit-CaOH	Hidroxilapatit	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$
Apatit-CaOH- <i>M</i>	Hidroxilapatit- <i>M</i>	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$
Apatit-CaF	Fluorapatit	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$
Apatit-CaCl	Klórapatit	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$
Svábit	Svábit	$\text{Ca}_5(\text{AsO}_4)_3\text{F}$
Turnaeaurit	Turnaeaurit	$\text{Ca}_5(\text{AsO}_4)_3\text{Cl}$
Johnbaumit	Johnbaumit	$\text{Ca}_5(\text{AsO}_4)_3\text{OH}$
Fermorit	Johnbaumit- <i>M</i>	$\text{Ca}_5(\text{AsO}_4)_3\text{OH}$
2008-009 diszkreditált	Stronadelfit	$\text{Sr}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$
Piromorfit	Piromorfit	$\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$
Mimetit	Mimetit	$\text{Pb}_5(\text{AsO}_4)_3\text{Cl}$
Klinomimetit	Mimetit- <i>M</i>	$\text{Pb}_5(\text{AsO}_4)_3\text{Cl}$
Alforsit	Alforsit	$\text{Ba}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$
Vanadinit	Vanadinit	$\text{Pb}_5(\text{VO}_4)_3\text{Cl}$

Az első apatit szerkezetmeghatározás Náray-Szabó Istvánhoz [33] és Martin Mehmelhez [34] köthető. A FAp $P6_3/m$ tércsoportban, 7 nem-ekvivalens atompozícióval ($\text{Ca}(1)_4\text{Ca}(2)_6[(\text{PO}(1)\text{O}(2)\text{O}(3)_2)_6\text{X}_2]$), valamint egy elemi cellában összesen 42 atommal írható le, amik ismertetése nemcsak a FAp szerkezetének megértéséhez hasznosak, hanem a különböző apatit fázisok, és helyettesítés okozta szerkezeti változások

bemutatására is, ezáltal a biológiai és szintetikus Ca-fázisok viselkedésének megértésére (2. táblázat).

2. táblázat Nem-ekvivalens pozíciók apatit-CaF (FAP)-ban (Hughes et al. 1989 [35] alapján)

Atom	Szimmetria	x	y	z
F	$\bar{6}$	0	0	$\frac{1}{4}$
Ca(I)	3	$\frac{1}{3}$	$\frac{2}{3}$	0.0001
Ca(II)	m	-0.0071	0.2423	$\frac{1}{4}$
P	m	0.3690	0.3985	$\frac{1}{4}$
O(I)	m	0.4849	0.3273	$\frac{1}{4}$
O(II)	m	0.4667	0.5875	$\frac{1}{4}$
O(III)	1	0.2575	0.3421	0.0705

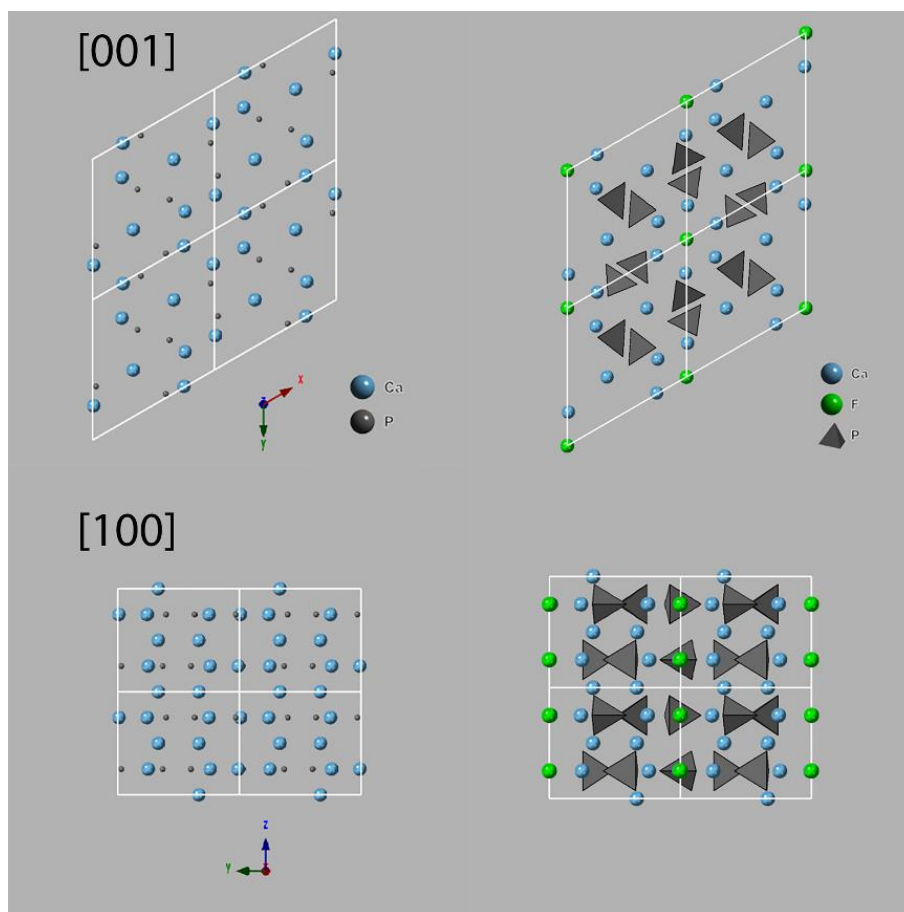
3. táblázat $P6_3/m$ tércsoportban szimmetria pozíciók a Nemzetközi Krisztallográfiai Táblázatok alapján

Atom	Wyckoff pozíció	Ekvivalens pozíciók
F	2a	$(0,0,\frac{1}{4}) (0,0,\frac{3}{4})$
Ca(I)	4f	$(\frac{1}{3},\frac{2}{3},z) (\frac{2}{3},\frac{1}{3},z)$ $(\frac{2}{3},\frac{1}{3},z+\frac{1}{2}) (\frac{1}{3},\frac{2}{3},\frac{1}{2}-z)$
Ca(II) P O(I) O(II)	6h	$(x,y,\frac{1}{4}) (1-y,x-y,\frac{1}{4}) (y-x,1-x,\frac{1}{4})$ $(1-x,1-y,\frac{3}{4}) (y,y-x,\frac{3}{4}) (x-y,x,\frac{3}{4})$
O(III)	12i	$(x,y,z) (1-x,1-y,1-z) (1-x,1-y,\frac{1}{2}+z) (x,y,\frac{1}{2}-z)$ $(1-y,x-y,z) (y,y-x,1-z) (y,y-x,\frac{1}{2}+z) (1-y,x-y,\frac{1}{2}-z)$ $(y-x,1-x,z) (x-y,x,1-z) (x-y,x,\frac{1}{2}+z) (y-x,1-x,\frac{1}{2}-z)$

A szerkezet alapját a hexagonális tömött illeszkedésben (hcp) rendeződő P adja. A hcp esetén minden második réteg identikus, így a rétegek periodicitása ABAB alakban írható fel. Két réteg között tetraéderes, illetve oktaéderes koordinációjú házagok találhatók. Az oktaéderes hézagokat a Ca(I), illetve ClAp apatit esetén a Cl $(0,0,0; 0,0,\frac{1}{2}; \frac{1}{3},\frac{2}{3},0; \frac{1}{3},\frac{2}{3},\frac{1}{2}; \frac{2}{3},\frac{1}{3},0; \frac{2}{3},\frac{1}{3},\frac{1}{2})$ tölti ki. FAp esetén a csatornakitöltő F, a P rétegekkel egy síkban helyezkedik el $(0,0,\frac{1}{4}; 0,0,\frac{3}{4})$. A tökéletes hcp illeszkedéstől eltérő torzult szerkezetet a tetraéderes hézagokban helyet foglaló Ca(II) eredményezi [24], [36], [37].

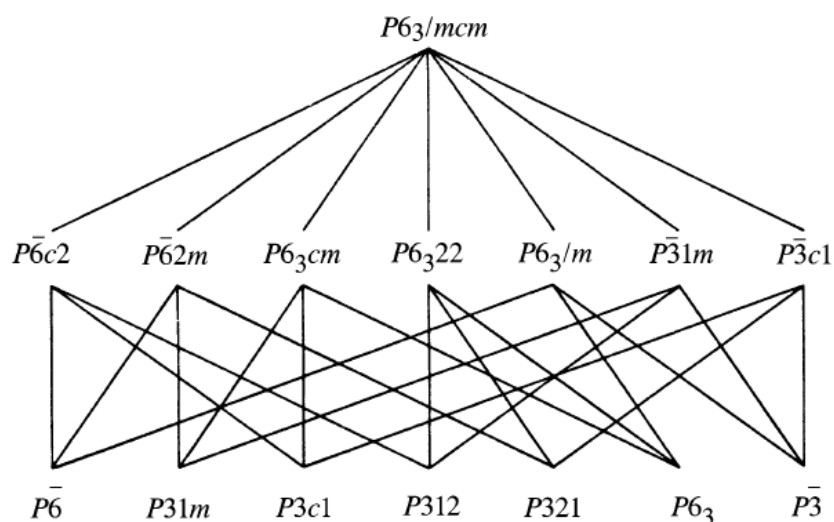
A szimmetriaelemek szerinti összetartozó atomok csoportjait az úgynevezett Wyckoff pozíciókkal jelöljük. A $P6_3/m$ tércsoportú FAp szerkezetének Wyckoff pozícióit a 3. táblázat mutatja. Az általános képlet szerinti X pozíció a c-tengely menti elhelyezkedése függ a betöltő elem méretétől, így F esetén $(2a, z = \frac{1}{4}, \frac{3}{4})$, míg Cl esetén

($2b$, $z = 0$, $\frac{1}{2}$). A $4f$ pozíciójú Ca(I) atomok mindegyike 9 db O atomhoz kapcsolódik, amik közül 6 db egy torzult trigonális prizma csúcsain helyezkednek el, 3 db pedig a Ca(I) központú prizma oldalaitól távolabb található. A Ca(II), P, O(I) és O(II) $6h$ szerint helyezkedik el a kristályrácsban. A Ca(II) atomok a c -tengelyre merőlegesen háromszögeket alkotnak, amiket $00l$ irányú 6_3 csavartengely szimmetria jellemez, vagyis a Ca(II) planáris háromszögek az F aniont veszik közre $\frac{1}{2}c$ léptetéssel [24], [38], [36].



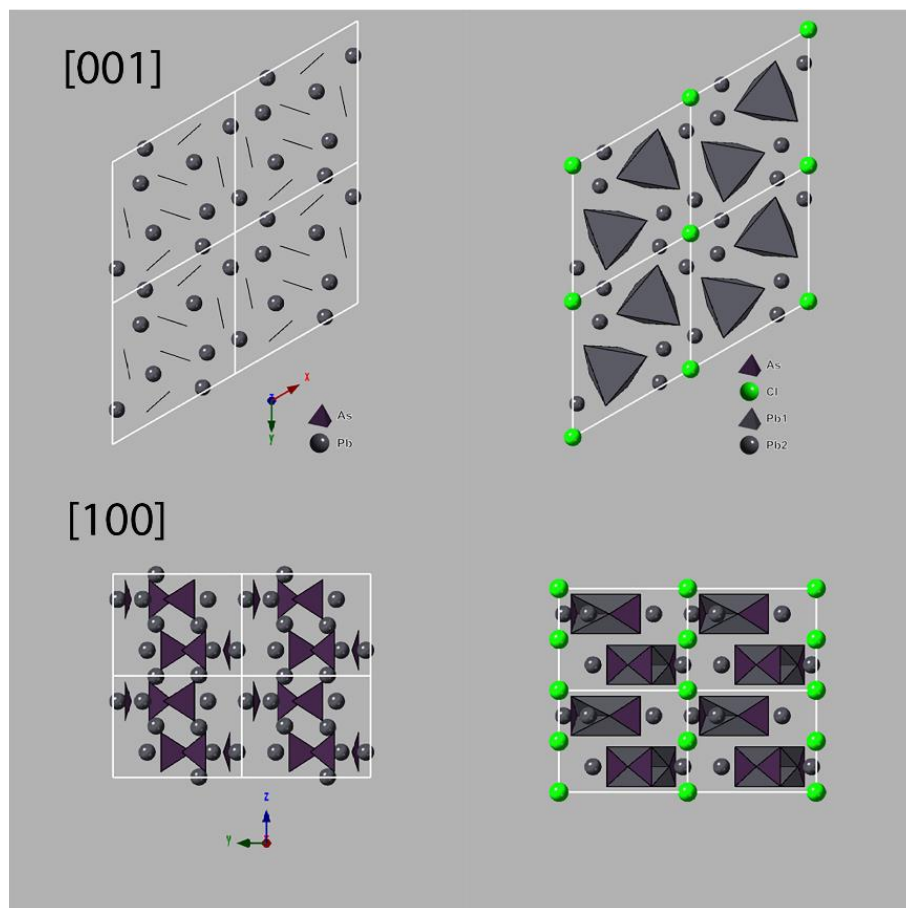
1. ábra Apatit-CaF (FAp) $P6_3/m$ szerkezeti modelljei $[001]$ és $[100]$ vetületekből

Az apatit szerkezetek tércsoportbeli hierarchiai felépítését három családba soroljuk, a Mn_5Si_3 ($P6_3/mcm$) arisztotípusból levezetve: $P6_3/m$, $Cmcm$ és $P6_3cm$. A teljes szerkezeti rokonságot a 2. ábra mutatja. A leggyakrabban előforduló tércsoportok: $P6_3/m$ (57%), $P6_3$ (21%), $P\bar{3}$ (9%), $P\bar{6}$ (4,3%), $P2_1/m$ (4,3%) és $P2_1$ (4,3%) [38]. Az „apatit” kristályszerkezetét Náray-Szabó (1930) és Mehmel (1930) $P6_3/m$ tércsoportúnak határozták meg.



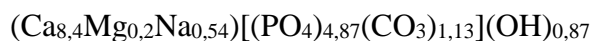
2. ábra A $P6_3/mcm$ tércsoport lehetséges alcsoportjai és azok kapcsolatai (Nemzetközi Krisztallográfiai Táblázatok)

A $P6_3/m$ szimmetria csökkenését leggyakrabban vakancia, kémiai helyettesítés, vagy ezek együttes hatásai okozhatják. Az apatit szerkezetben minden pozícióban lehetséges helyettesítés. Gyakran az X pozíció kémiai összetétele a c -tengelyre merőleges tükörsík (m) megszűnését eredményezi és a szimmetria $P6_3$ -ra redukálódik [38]. McConnell [39] majd LeGeros [40] írták le először, hogy az apatit szerkezetben CO_3^{2-} helyettesítés lehetséges az X pozícióban (A-típus), illetve a PO_4 tetraédereket helyettesítve (B-típus). A B-típusú helyettesítés esetén, a sztöchiometria megtartása miatt csatolt helyettesítésre és/vagy vakanciára is szükség van. Bioapatit esetén a csatolt helyettesítés igen gyakori. A PO_4^{3-} - CO_3^{2-} helyettesítés során +1 töltést a Ca^{2+} - Na^+ helyettesítés, illetve az X pozícióban vakancia egyenlíti ki. Ritkábban a töltéskompenzáció PO_5 dipiramisként, plusz O beépülésével, vagy pedig PO_3 trigonálisan koordinálva, O eltávolítással valósul meg. Így a PO_4 tetraédereket akár 100%-ban CO_3 (vagy AsO_3 , vagy akár BO_3) háromszögek helyettesíthetik. Eerre példa a finnemanit ($\text{Pb}_{10}[(\text{AsO}_3)]_6\text{Cl}_2$ [41], ahol az AsO_3 planáris háromszögek a c -tengellyel párhuzamosan helyezkednek el.



3. ábra *A. finnemani* ($Pb_{10}[(AsO_3)_6Cl_2]$) $P6_3/m$ szerkezeti modellje $[001]$ és $[100]$ vetületből. *A. finnemani* esetén az AsO_3 háromszögek a c -tengellyel párhuzamosan rendeződnek.

Bioapatitokban 4-6 wt% CO_3^{2-} mérhető, azonban a karbonátok pozíciója nem ismert [1]. Egyes szerzők szerint a CO_3^{2-} helyettesítés elsősorban a PO_4 tetraédereket érinti. Ennek következménye a bioapatit könnyebb oldhatósága, mivel a $Ca-CO_3$ kötés gyengébb, mint a $Ca-PO_4$ [1],[24],[28]. Az eddigi legrészletesebb kémiai elemzést bioapatitra Li és Pasteris [26] munkájában találjuk. Ez alapján a bioapatit nem tekinthető HAp-nak, rácshibákkal terhelt, részben nem-sztöchiometrikus. Munkájuk során *Mesoplodon densirostris* bálna rostrumát vizsgálták XRF módszerrel és az alábbi kémiai összetételt határozták meg:



Méréseik során átlagosan 1,70 Ca/P arányt mutattak ki, amit 8 wt%-nyi CO_3^{2-} jelenlétével magyaráztak. A Ca és P mellett (O-t nem számolva) a Na és a Mg jelenléte mérhető. Megjegyzendő, hogy a *Mesoplodon densirostris* rostrum egy, a gerincesek körében ismert

hipermineralizált csontszövet. Így tehát nem ideális referencia egy „átlagos” bioapatit kémiai összetételére vonatkozóan.

Fontos megemlíteni, hogy a bioanyagok kutatása szempontjából más, nem apatit szerkezetű Ca-foszfát szerkezetek is relevánsak. Sokféle Ca-foszfát ismert, amelyeknek a szerkezete, összetétele különböző, így fizikai-kémiai tulajdonságaikban sem azonosak. Az ilyen jellegű megkülönböztetésnek elméleti érdekességen túl orvostani vonatkozása is lehet, például pH változásra való eltérő viselkedés [1]. A dolgozat tartalmi kereteibe sajnos nem fér bele, így részleteiben nem tárgyalom:

1. apatit szerkezetű, de nem Ca-foszfátokat
2. a nem apatit szerkezetű Ca-foszfátokat
3. az összes lehetséges tércsoportú Ca-foszfátot.

A kristályok szerkezetét a gyakorlatban diffrakciós adatkészletből határozzuk meg, így szimulációkat készítettem, hogy a $P6_3/m$, a $P6_3$, a $P\bar{3}$ és a $P1$ tércsoportú apatitok hogyan ismerhetők fel, hogyan különböztethetők meg egymástól.

Bioanyagok kutatása

Bioanyagoknak (Biomaterials) azon anyagokat nevezzük, amelyeket orvosi, fogászati célokra fejlesztenek, használnak. A „bioanyag” első említése 1987-ből származik [42], azóta a bioanyag megnevezés definíciója számos alkalommal módosult. Legutóbb Dongli Shi [43] az alábbiak szerint fogalmazott: „A bioanyagok olyan anyagok, amelyeket a sérült vagy hiányzó szövetek javítására, megtámasztására vagy helyettesítésére gyártanak és alkalmaznak. Négy különböző kategóriába sorolhatóak: fémek, kerámiák, polimerek és kompozitok.”

Számos aspektusból érdemes foglalkozni a bioanyagokkal. Egyrészt 2013-ban 1 millió 200 ezer csípő- és térd-protézis műtétet hajtottak végre világszerte, és ez a szám minden évben növekszik. Ha figyelembe vesszük a csonttörések, csontbetegségek, helyreállító műtétek, fogtömések, fogpótlások és gerincműtétek számát, belátható, hogy majd mindenkit érintő (előbb vagy utóbb, így vagy úgy) témakörrel van szó [44]. Nem mindegy azonban, hogy milyen anyagokat használunk fel bioanyagként. Kiindulási szempont lehet a bioásványok (bioapatit csontban és fogzománcban) mechanikai és kémiai tulajdonságainak mérése azzal a céllal, hogy a bioanyagok tulajdonságai minél

hasznosabbak legyenek a természetes bioásványokéhoz (replikálási funkcionalitás). Ez alapján az alábbi referenciarendszert alkalmazzák bioanyagokra [44]:

Biokompatibilitás: Olyan anyag, amely fennmarad és megfelelő módon működik a biológiai környezetben anélkül, hogy negatív reakciókat okoznának a biológiai szövetben. A biokompatibilitás három fontos tulajdonsága a bioanyagok szempontjából:

1. biokémiai összeférhetőség (toxicitás, túlzott gyulladás, karcinogenitás hiánya)
2. biomechanikai összeférhetőség (pl. ésszerű egyezés a merevségben)
3. biológiai tapadás az anyag-szövet érintkezésnél [45], [46].

Bioinert: Olyan anyag, amely nem indukál bioadhéziós kötődést a bioanyag és a szövet között. Ezenkívül nem okoznak negatív reakciókat. Példa erre az alumínium-oxid, cirkónium-oxid, titán és a Si-nitrid.

Bioaktív: Olyan anyag, amely indukálhatja a bioadhéziót a szöveti határfelületen, vagyis kémiai és biológiai kötés kialakítására képes. Ez többnyire a beültetés utáni időszak elején történik meg, anélkül, hogy az eredeti szövetet módosítaná. A határfelületen képződő fázis többnyire CHAp (karbonát-hidroxilapatit), ami hasonló a csontokhoz.

Biorezorbeális: Olyan anyag, amely fokozatosan oldódik, és végül *in vivo* teljesen új szöveté válik; ideális esetben a rezorpció arányuk hasonló a csontszövet rezorpció sebességéhez [43],[46],[47].

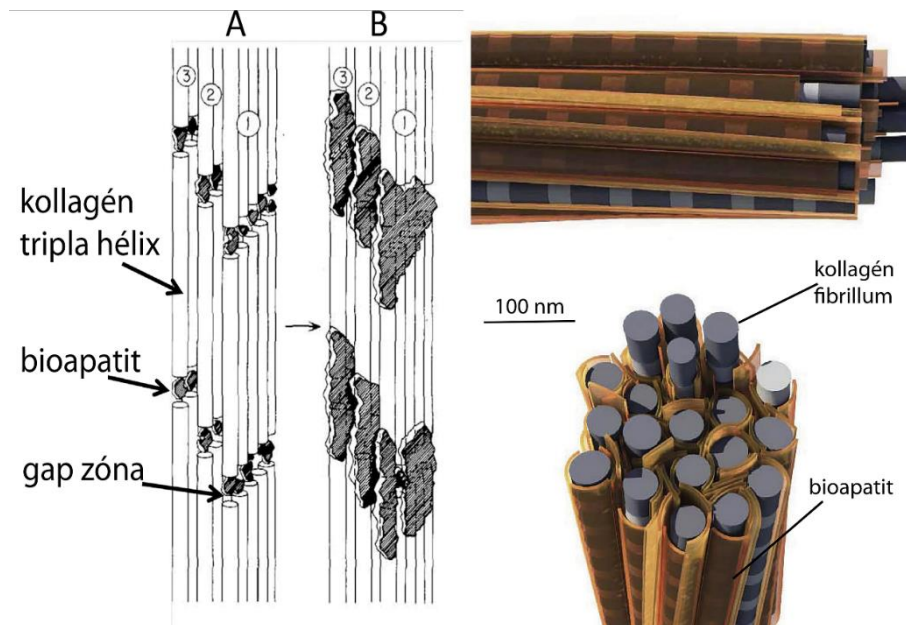
Oszteoinduktív: Képes elősegíteni az új csont képződését (pl. a progenitor sejtek stimulálása osteoblastok kialakulásához).

Oszteokonduktív: Az anyag felületén elősegíti a csontképződést, a környező csont felépülésének serkentése, vázként vagy sablonként történő funkció az új csont kialakulásának irányításához.

Oszteointegratív: Kémiai kötés kialakítása közvetlenül a csonttal, például egy implantátum beépítése a csontba, annak rögzítése, fizikai stabilizálása.

Oszteogenezis: Új csont képződésének a folyamata [48],[49],[50].

Ha Shi [43] definícióját alkalmazzuk, a csont szerves-szervetlen nanokompozit, ami kollagén rostokból, fehérjékből és bioapatitból épül fel. Az emberi csontokat például mint korábban említettem, általánosan 55-60 wt% bioapatit, 30 wt% kollagén és egyéb fehérjék, illetve 10-15 wt% víz alkotják [23]. A nagy hosszúságú kollagén fibrillumok (>2µm) kötegekbe rendeződnek, olyan vázat alkotnak, ami segíti, irányítja, rendezi a bioapatit lemezeket, amik kb 10-20 nm szélesek és 20-50 nm hosszúak [4],[18],[51].



4. ábra Bioapatit rendeződése a kollagén fibrillumok mentén (Alexander és mtsi. [4] és Schwarcz [51] alapján)

Több elképzelés is létezik a csont képződéséről, bioapatit lemezek rendeződéséről, illetve a szerves környezetükkel való kapcsolatukról. A kollagén-bioapatit közötti szoros kapcsolat részleteiben eddig ismeretlen, azok mind a mai napig vizsgálat tárgyát képezik [51]. Az viszont ismert, hogy a csontok elsősorban hierarchikus struktúrájuknak köszönhetően bírnak olyan ellenálló erővel és rugalmassággal, amivel az alkotórészek külön-külön nem. [23], [52]. Nem elhanyagolható szempont a bioapatit szervezetben betöltött szerepe sem, az a csontok szerves, „kemény” alkotója, a szervezet Ca és P raktára is egyben. Mindemellett a csont fontos vérképző szervünk, ami folyamatos körforgásban lebomlik és újratermelődik.

Különbséget kell tennünk geológiai apatit, bioapatit és szintetikus apatit között. Számos publikáció foglalkozott ezzel, és emelte ki az apatit jelentős kémiai-szerkezeti alkalmazkodóképességét, változatosságát [1], [13], [23], [24], [39], [40]. Ezek közül a bioapatit esetén, ismét, kiemelendő a CO_3^{2-} helyettesítés, ami fontos befolyásoló szerepet játszik az apatit szerkezet fizikai-kémiai tulajdonságaiban, oldhatóságában, illetve a csontképző sejtek (osteoblastok) képzésében [49], [55]. Bioapatit esetén olyan kristály képződéséről beszélünk, amit a szervezet képes létrehozni, szabályozni, és feloldani is.

Úgy tűnik tehát, hogy a megfelelő bioanyagok előállításához számos információra van szükségünk, ha a cél a bioásvány minél pontosabb helyettesítése. Ca-foszfát bioanyagok előállítása során például az előállítás módszere meghatározza a képződő anyag kristályfázisát, oldhatóságát, morfológiáját, felületi aktivitását és krisztallit méretét. Számos előállítási módszer létezik [44]:

1. szilárd fázisú reakció
2. plazmaporlasztásos bevonatgyártás
3. mechanoszintézis
4. alacsony hőmérsékletű nedves kémiai szintézis
5. sol-gel módszer
6. hidrotermás módszerek.

Így sokféle késztermék lehet, ahol figyelembe kell venni a felhasználáshoz legoptimálisabb: krisztallit méretet, porozitást, pórus méretet, helyettesítés fajtáját és mértékét, illetve az előállítást követő formázási eljárásokat (tömörítés, szinterelés, stb.) is. Mindezek megismerésében fontos szerepe van a krisztallográfiának. Attól függően, hogy milyen információra vagyunk kíváncsiak (kémiai összetétel, szerkezet, morfológia, textúra, felszíni aktivitás), szükséges megválasztanunk egy, esetleg több vizsgálati módszert. Atomi, illetve nanométeres mérettartományt illetően elsősorban diffrakciós, illetve spektroszkópai módszerek közül választhatunk. A bioanyagok vizsgálata során mindkettőre láthatunk számos példát. Ezek a módszerek alkalmasak a bioapatit vizsgálatára is, a disszertációm keretein belül a röntgen pordiffrakciót (XRPD), a transzmissziós elektronmikroszkópiát és ahhoz csatolt energiadiszipatív röntgen spektrometriát (TEM, EDS) használok.

Összességében a bioanyagok kutatása fontos ismereteket és feladatokat ad a mineralógusoknak is az apatitszerkezet felhasználhatóságáról és sokszínűségéről, illetve az emberi szervezetre gyakorolt hatásairól. Fontosak lehetnek, mert:

1. a kutatások során használt gyártási technikákkal előállított és vizsgált anyagok mind újabb információkkal szolgálnak egy igen összetett rendszerről, a Ca-foszfát ásványokról.
2. új, modern kísérleti és vizsgálati technikák alkalmazásával a kristálytani (akár atomi) tulajdonságok jellemzésére nyílik módunk nanokristályos anyagok esetén.

A bioanyagok gyártása, eljárások fejlesztése és az analitikai módszerek megválasztása az apatitszerű bioanyagok jellemzésére az előállítás előtt, alatt és után, majd alkalmazásuk élő szervezetekben (többnyire emberekben) nem geológiai példája az ásványtan és krisztallográfia lehetőségeinek. Földtudósoknak foglalkozni kell, és nyomon kell követniük a bioanyagok kutatását is.

Alkalmazott vizsgálati módszerek

A kristályok szerkezetét a diffrakciós technikákkal nyert adatok értékelésével ismerhetjük meg. A mért intenzitáskészlet a kristályt alkotó tömegpontok helyéről és kémiai minőségéről is informál. A kristályrács periodikus sűrűségfüggvényén szórt (diffraktált) hullámok képét a sűrűségfüggvény Fourier-transzformáltja írja le, ami az ún. reciprokrács. A két rácskép közti összefüggést elsőként a Bragg-egyenlet [56] adta meg (ahol a kristályrácsot a d_{hkl} , a reciprokrácsot pedig a $\lambda/2 \sin\theta$ készletei képviselik):

$$2d_{hkl}\sin\theta = \lambda$$

ahol d_{hkl} kristálytani síktávolság θ a szóródás előreszórástól mért szögértéke, λ pedig a gerjesztő sugár hullámhossza. Az egyes tömegpontok szóróképességét f (atomi szórástényező), helyét az x, y, z koordináták adják meg, a d_{hkl} -t képviselő hullám amplitúdóját és fázisát leíró függvényt struktúrfaktornak (F_{hkl} , szerkezeti tényező) nevezzük, ami (egy elemi cellára vonatkozóan) felírható mint:

$$F_{hkl} = \sum_{j=1}^N f_j \exp 2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j).$$

Napjainkban egyre bonyolultabb és nehezebben vizsgálható anyagok szerkezethatározása válik lehetségessé. A kísérleti munkában a diffraktált intenzitásokat (I_{hkl}) mérhetjük, melyek az F_{hkl} -ek abszolút értékének négyzetei:

$$|F_{hkl}|^2 = I_{hkl}$$

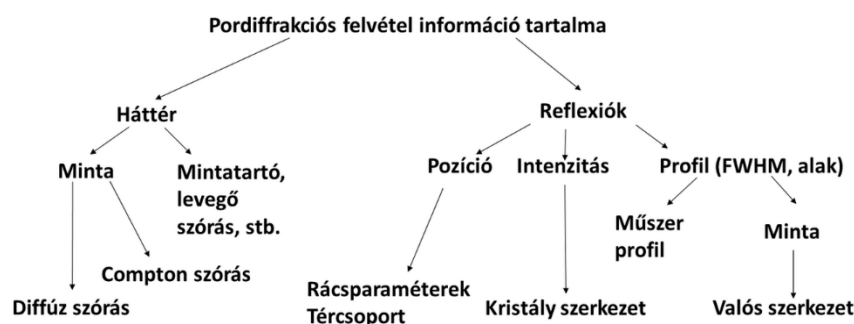
ráadásul a mért intenzitásokat az alábbiak is befolyásolják:

- A kristály definíció szerint végtelen kiterjedésű és periodikus. A reális kristályoknak azonban véges kiterjedése van, és a periodicitást hibák sértik.
- A diffrakciós adatok adott mérési időre átlagolt szerkezetről nyújt információt. Ez a tényező különösen a szerves anyagoknál jelentős.
- A diffrakciós adatok értelmezése hagyományosan a Bragg-reflexiók vizsgálatára korlátozódik, holott a kristályhibák a Bragg-reflexiók közti térben okoznak mérhető intenzitásokat.

A csontokat felépítő krisztallitok vizsgálata során is a fenti nehézségekbe ütközünk. Számos effektus módosítja a diffrakciós adatokat. Az átlag szerkezettől való eltérés csúcskiszélesedést okoz, majd széles diffúz szórást tapasztalhatunk. Így nem minden esetben lehetséges egyértelműen leírni, értelmezni a Bragg-reflexiókat. Ekkor válik szükségessé a diffúz szórás értékelése. A diffúz szórás leírására azonban a Bragg-egyenlet már nem alkalmas, ahhoz a Debye-egyenletet [57] használhatjuk.

Röntgen pordiffrakció (XRPD)

A röntgendiffrakció a röntgenfotonok szóródása elektronokon. Az elektronsűrűségnek az anyagban a hellyel való változása a röntgensugár interferenciáját eredményezi, így minden szerkezetről egyedi diffrakciós adatkészlet gyűjthető. Amíg a diffrakciós intenzitás-maximumok helye a kristályrács geometriáját adja meg, addig intenzitásuk a tömegpontok rendszámától függ. Pordiffrakció esetén az 5. ábra mutatja, hogy szerkezetvizsgálat során milyen információk olvashatóak ki a diffrakciós adatkészletből, illetve milyen kísérőjelenségeket kell figyelembe vennünk az adatok értékelésénél.



5. ábra Pordiffrakciós felvételtől kiolvasható információk [58]

Ha szerkezethatározás vagy szerkezetfinomítás a célunk, fontos, hogy kristályszerkezetét illetően homogén legyen a minta. Heterogén minta esetén a csúcsátlapolódások következtében csökkenhet az értékelés megbízhatósága. Továbbá nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy pordiffrakció esetén egy adott térfogatú krisztallitok sokaságát (porát) vizsgáljuk. A kísérleti munkában törekedni kell arra, hogy a porminta krisztallitjainak orientáció-eloszlása is homogén és izotróp legyen. Ha ez nem teljesül akkor az értékelés során ún. kitüntetett orientációt kezelni kell tudni.

Rietveld-szerkezetfinomítás

Hugo Rietveld 1967-ben [59] és 1969-ben [60] publikálta a szerkezetfinomítási eljárását, melyet eredetileg neutrondiffrakciós felvételekhez használtak. Az eljárást 1977-ben Young és munkatársai [61] adaptálták röntgen pordiffrakciós felvételekhez is, a röntgendiffrakció esetén ugyanis a diffrakciós csúcs alakja eltér a neutrondiffrakciós csúcs alakától (amely leírható egy Gauss-görbével), így bonyolultabb a modellezése. A röntgen pordiffrakció előnye a könnyű hozzáférhetőség és a mintával szemben támasztott kevésbé szigorú követelmények.

Rietveld-finomítás során a teljes diffraktogram információtartalmát használjuk, amihez szükségünk van egy pontosan meghatározott műszerprofilra is. A teljes eljárás szerkezetmodellt is igényel, mivel a csúcsok elméleti helyét és intenzitásértékeit a szerkezetmodellből számolja. A finomítás alapja a mért adatok és a számolt értékek közötti legkisebb különbség, a legjobb egyezés elérése.

$$Min = \sum_{i=0}^{n-1} (w_i(Y_{obi} - Y_{calci})^2)$$

A Rietveld-finomítás a csúcsokat befolyásoló tényezők közül az alábbiakkal számol:

- struktúrfaktorok
- multiplicitás
- Lorentz-faktor
- polarizációs faktor
- hőmérsékleti vagy atomi mozgástényező
- abszorpció
- kitüntetett orientáció
- extinkciós együtthatók

Ezen tényezők alapján a következő formula írja le a diffraktált intenzitásprofil:

$$Y_{ci} = s \sum L_{hkl} |F_{hkl}|^2 \varphi(2\theta_i - \theta_{hkl}) P_{hkl} A + Y_{bi}$$

ahol Y_{ci} az i -ik mérési pontra számolt intenzitásérték, s skálafaktor, hkl Miller-index, L_{hkl} Lorentz - és polarizációs faktor, F_{hkl} struktúrfaktor, φ műszerprofil függvénye, P_{hkl}

kitüntetett orientáció, A tömegabszorpciós együttható, Y_{bi} pedig az i -ik mérési pont háttérszórása. A Rietveld-finomítás tehát nem más, mint ezen paramétereket leíró függvények konvolúciójából számolt görbe. Az eljárás elvi alapjait és részleteit Young [62] művében találjuk.

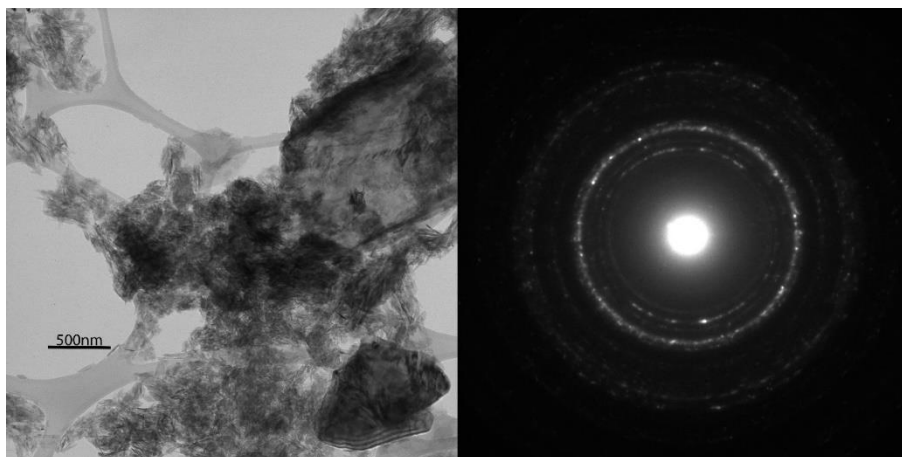
A Rietveld-finomítás során mindig kis mértékben változtathatóak a megadott paraméterek, így egy finomítás jósága nagyban függ a kiindulási modelltől. Nem megfelelő modell választása esetén a Rietveld-finomítás hibás eredményhez vezet. Egy szerkezetfinomítás akkor tekinthető jónak, hogyha a mért és számolt diffrakciós görbe közti különbség négyzete (minden fázisra kiszámolva) minimális. A munkám során a *Bruker Topas 4.0* és *6.0* programokban végeztem Rietveld-finomítást.

Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)

A transzmissziós elektronmikroszkóp használatakor nagy (100 - 300 kV) energiájú elektronsugarat használunk, amelynek igen kis ($0.037 - 0.0196 \text{ \AA}$) hullámhossza a képalkotásban atomi felbontást is lehetővé tesz. A képalkotás a hagyományos optikai mikroszkóppal analóg módon, viszont elektronmágneses lencsék segítségével történik. A mikroszkópban a mintán áthaladó és diffraktált elektronokból az objektívlencse feladata a képalkotás. Attól függően, hogy az objektívlencse képsíkját vagy a diffrakciós (hátsó fókusz) síkját képezzük le, készíthetünk valós képet vagy diffrakciós felvételt a mintáról. A TEM-el végezhető kísérleti lehetőségek igen sokfélék lehetnek, dolgozatomban a továbbiakban a szelektált területű elektrondiffrakcióra (SAED) „fókuszálok”.

Szelektált területű elektrondiffrakció (SAED)

Mint ahogy a nevében is benne van, a szelektált területű elektrondiffrakció során egy lehatárolt területről készítünk diffrakciós felvételt. A diffrakciós kép közepe a direkt sugár, ami a kölcsönhatást nem szenvedett és az előreszórt sugárnyaláb. A további reflexiók a valós rács reciprokrácsaként jelennek meg, intenzitásukat és pozíciójukat ideális esetben a struktúrfaktor írja le. Ha a SAED felvétel orientáltan, meghatározott kristálytani $[uvw]$ irány felől készül, azon 2D reciprokrács jelenik meg. Több, különbözőn orientált SAED indexelésével meghatározható a valós rács tércsoportja. Polikristályos vagy nanokristályos minta esetén azonban nem mindig lehetséges orientált felvétel készítése, helyette „gyűrűs” diffrakció jelenik meg. Nanokristályos, közel amorf minták esetén ezek a gyűrűk szélesek, elmosódottak, diszkrét határral nem rendelkeznek, így azokból ha integrált intenzitás profilt számolunk, diffúz szórási képet kapunk. (6. ábra)

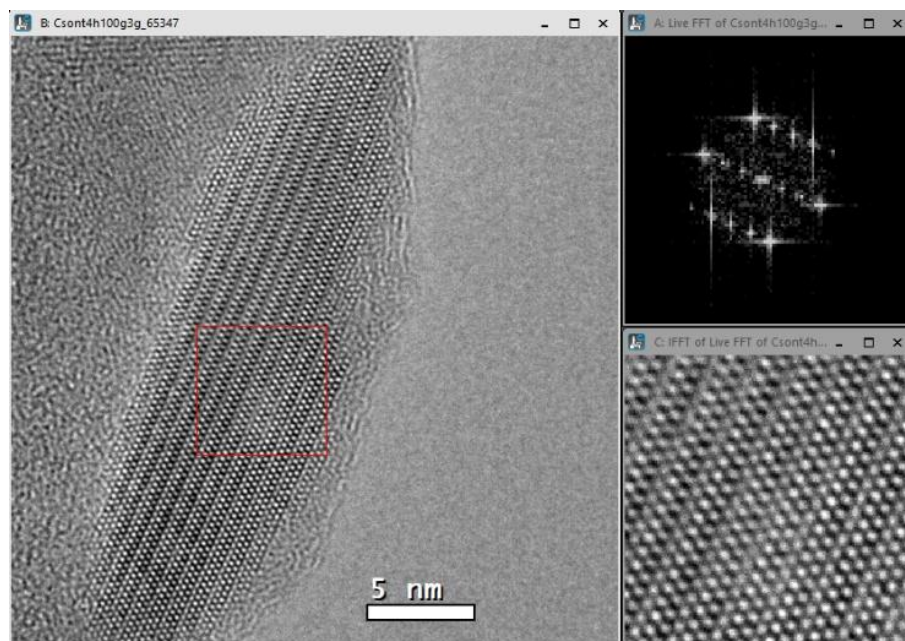


6. ábra Régészeti csontminta (Kehida-Fövényes) (a) BF és (b) SAED felvétel

Mint korábban írtam a struktúrfaktor (F_{hkl}) egy komplex mennyiség, mely leírja a kristályrács diffrakciós maximumainak amplitúdóját és fázisát. A diffrakciós felvételek mérése során a reflexiók intenzitása mérhető, ami ideális esetben a struktúrfaktor abszolútértékének – vagyis amplitúdójának – négyzetével arányos.

$$I_{hkl} = A^2 = |F_{hkl}|^2$$

Így tehát a fázisértékek diffrakciós adatkészleteken közvetlenül nem mérhetők (fázisprobléma), viszont transzmissziós elektronmikroszkópban nagyfelbontású képalkotással lehetséges a fázisok mérése. Nagyfelbontás során olyan mintaterület vizsgálható, mely elég vékony ($<20\text{ nm}$). Ha a nagyfelbontással készített felvételen Fourier-transzformációt végzünk, minden hkl értékhez tartozó amplitúdó és fázisérték visszanyerhető. Egy nagyfelbontású felvétel Fourier-transzformációjával olyan képet kapunk, melyen a rács periodikus részleteinek diszkrét intenzitásmaximumok (ún. Fourier-komponensek) felelnek meg.



7. ábra Bioapatit egykristály HRTEM képe (a) a piros négyzettel jelölt terület Fourier-transzformáltja (FFT) (b) és az FFT inverz-Fourier-transzformáltja (c)

A Fourier-transzformon az amplitúdó és a fázis értékek is mérhetők. Egy Fourier-transzform képből inverz transzformációval visszanyerhető az eredeti kép. Összességében elmondható, hogy egy területhatárolt elektrondiffrakciós felvétel nem más mint a kristályrács töltéssűrűség-eloszlásának Fourier-transzformjának négyzete, míg a nagyfelbontású kép ennek inverz Fourier-képe. A két képalkotási technika együttes alkalmazásával elegendő információ gyűjthető a vizsgált anyag töltéssűrűség-eloszlásáról ahhoz, hogy annak szerkezetének vizsgálata lehetséges legyen.

A TEM felvételeket Philips CM20 200 kV-os, JEOL 3010 300 kV-os és FEI THEMIS 200 kV-os transzmissziós mikroszkópokon készítettem. A felvételek értékeléséhez *CRISP*, *Digital Micrograph* és *Adobe Photoshop* programokat használtam.

Szerkezetépítés, Diffrakciós szimuláció

Amorf, illetve nanokristályos anyagok jellemzése kísérleti diffrakciós adatok alapján sok esetben nehéz. Ennek legjelentősebb oka a Bragg-reflexiók mérettől függő kiszélesedése, valamint a diffúz szórás. Ilyen esetben célszerű a vizsgálni kívánt anyagról szerkezeti modellt készíteni, és a modell-szerkezetet felhasználva, diffrakciós adatkészletet (Fourier-transzformot) szimulálni. Ehhez a szükséges információk: a vizsgálni kívánt anyag kristálytani alapadatai (rácsparaméterek, tércsoport, kémiai összetétel, atomkoordináták, kristályméret és -alak, stb) – amik alapján felépítjük a

kristályszerkezetet –, illetve a kölcsönható sugárzás (elektron, röntgen, neutron) hullámhossza, kölcsönhatás jellemzése. Ezen adatok ismeretében számos program segítségével nyílik lehetőség egykristály, illetve pordiffrakciós felvételek szimulációjára. Az így előállított diffrakciós adatkészlet közvetlen módon is értelmezhető, összehasonlítható a rendelkezésre álló kísérleti diffrakciós adatokkal. A diffrakciós adatkészlet szimulációja során érdemi különbség léphet fel, ha a szórási adatkészletet a Bragg-egyenlet, vagy a Debye-egyenlet alapján számoljuk.

A szimuláció kiváló lehetőséget nyújt az ismert és ismeretlen anyagok diffrakció során megjelenő adatkészletének a modellezésére, ami nagy segítség, ha az adott kristály kísérleti úton nehezen vizsgálható. *CrystalMaker*, *CrystalDiffraction* és *JEMS* programok segítségével négy egyedi szerkezetű apatit kristályt szimuláltunk, az alábbi kérdésekre keresve választ.:

- Milyen hatással van a kémiai összetétel változása a diffrakciós adatkészletre?
- Miképpen különíthetőek el a hasonló szerkezetű anyagok diffrakciós adok alapján?

Ennek vizsgálatára elektron egykristály és röntgen-pordiffrakciós felvételeket szimuláltunk apatit szerkezetekre [001] és [210] irányok szerint.

Eredmények

Régészeti daganatos betegségben átalakult csontminták

Jelenlegi világunkban a rosszindulatú daganatok az egyik leggyakrabban előforduló, halált okozó megbetegedések. Az iparosodás óta ennek a kóros megbetegedésnek a gyakorisága megnövekedett, ami összefüggésben van a hosszabb élettartammal, illetve karcinogén anyagok használatával. A történeti korú népességeket érintő daganatos megbetegedések pontos gyakoriságának meghatározását ugyanakkor számos tényező nehezíti. A lágy szöveteket érintő megbetegedések nem maradnak meg, így csak a csontokat érintő megbetegedések vizsgálata lehetséges. Emellett a talajban lezajló tafonómiai jelenségek is nehezíthetik a pontos diagnózis felállítását [63], [64].

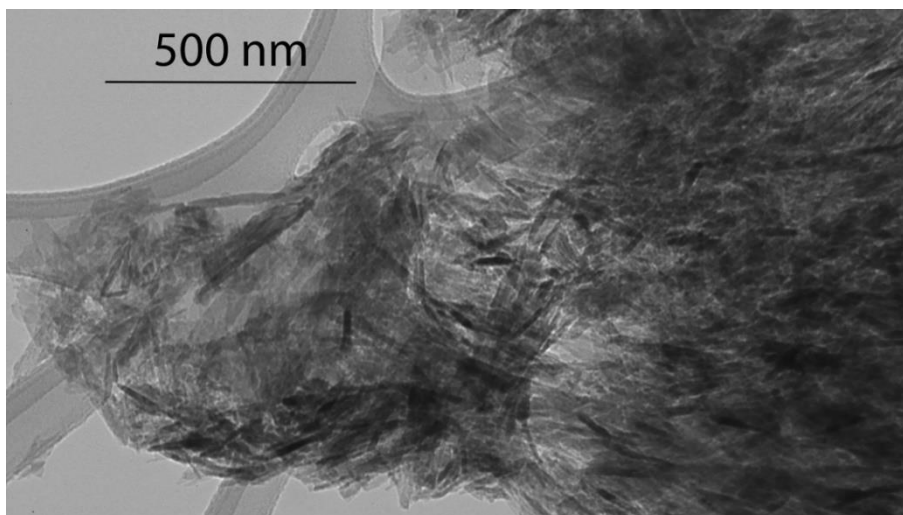
Daganatos csontok ásványtani vizsgálatáról eddig kevés tanulmány született [65], [29]. Ezek a tanulmányok azt mutatták, hogy a daganatos csontszövet krisztallitjainak mérete kisebb, mint a normál csont krisztallitjaé. A krisztallitok szövete rendezetlen, és a kémiai összetételük is eltérő, magasabb a CO_3^{2-} tartalmuk. Két régészeti mintát vizsgáltam (Kehida-Fővenyes, Kaposvár 61. út 2 lelőhely¹), amelyeken daganatos elváltozás nyomai voltak felismerhetők [66], [67]. A Kehida-Fővenyes lelőhelyről származó egyénből vett csontmintát egy 7-8. században élt, 40-50 év közötti férfi csípőcsontjából vettük, míg a kaposvári egy 11. században használt temetőbe eltemetett, idős nő (50+ éves) csípőcsontjából van. A mintavétel után achát mozsárban etanolos híg szuszpenziót készítettem, amit lacey-karbonsal bevont Cu-rostélyra cseppentettem fel.

Munkánk célja ebben az esetben az volt, hogy megismerjük a daganatos csontokat felépítő bioapatitot. A kérdés megoldásához elektrondiffrakciós (SAED) és nagyfelbontású elektronmikroszkópiai (HRTEM) technikákat alkalmaztunk. A méréseket a MTA Energiatudományi Kutatóközpont Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Kutatóintézetének Vékonyréteg-fizika Laboratóriumában végeztem, Kovácsné Kis Viktória segítségével. A SAED mérések Philips CM20 (200 kV, LaB_6 katód, Imaging Plate) transzmissziós elektronmikroszkóppal, a HRTEM felvételeket JEOL 3010 (300 kV, LaB_6 katód, CCD kamera) transzmissziós elektronmikroszkóppal készültek. Az EDX

¹ A leletek a Magyar Természettudományi Múzeum Embertani Tárának gyűjteményében található (Kaposvár 61. út 2 lelőhely 2250. objektum, leltári szám: 2010.2.65. és Kehida Fővenyes 9/B. sír, ltsz: 2017.4.9.)

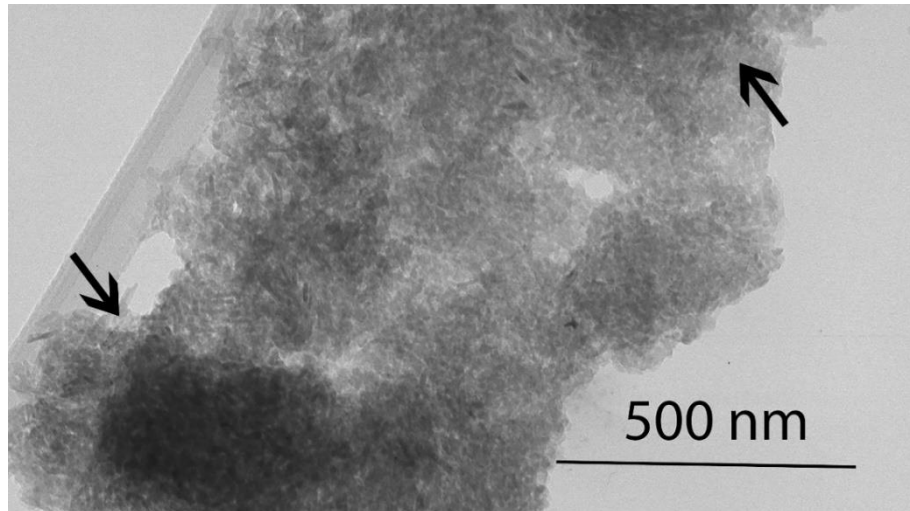
mérések Bruker Xflash 5030T SDD detektorral készültek, 100 s gyűjtési idővel, 4-5% holtidővel.

A TEM világos látóterű (BF) képeken jól látható a kristályok alakja és mérete. A Kehida-Fővényes lelőhelyről származó minta esetében közel 200 nm hosszú 30-40 nm széles, míg a kaposvári minta esetében 20-30 nm hosszú és 5-10 nm széles kristályok figyelhetők meg (8. és 9. ábra).



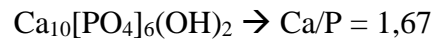
8. ábra kehida-fővényesi minta BF felvételén jól látszanak a 150-200 nm hosszú, tűs krisztallitok, amik rendeződése hossz tengelyükkel közel párhuzamos

Eltérés mutatkozik a kristályok rendeződésében is. Míg a kehida-fővényesi mintában a krisztallitok a hossz tengelyükkel közel párhuzamosan, egyenletes sűrűséggel rendeződnek, addig a kaposvári mintában a krisztallitok rendezetlen halmazt alkotnak, néhol sűrűbben tömörödve (9. ábra). A kehida-fővényesi mintában a krisztallitok rendeződése hasonló a normál csontokban vizsgálható szövettel (lásd *A csontok vizsgálatának kutatástörténete* fejezet), de a krisztallitok mérete 4-5x nagyobb (8. ábra). A kaposvári minta szövete és a krisztallitok mérete eltér a normál csontokétól. Erre magyarázatot adhat, hogy a csontképződés folyamatának eltérő fázisában történt a degenerálizáció. A kehida-fővényesi minta mindenképpen újdonság, hiszen a korábban leírtakkal ellentétben nem méretcsökkenés, hanem méret növekedés figyelhető meg.



9. ábra A kaposvári minta BF felvétele: A bioapatit kristallitok apró táblák, amik rendezetlen szövetet alkotnak

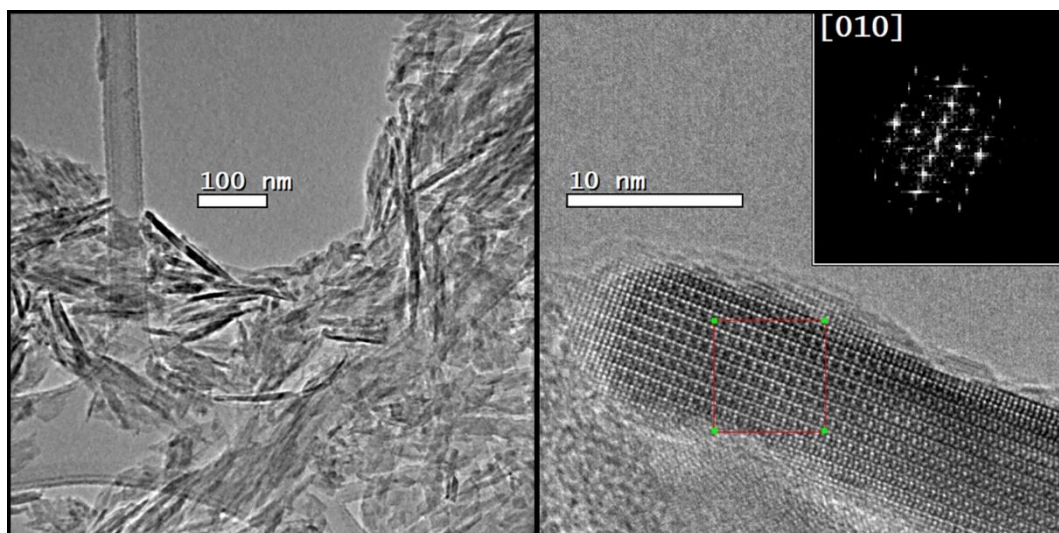
A két minta között ugyanakkor hasonlóságok is megfigyelhetők. A TEM-EDS vizsgálatok alapján a kémiai összetételük közel azonos. A kehida-fővényesi minta Ca/P aránya átlagosan 2,05, míg a kaposvári mintában átlagosan 2,00 (4. táblázat). Ez a Ca/P arány abban az esetben lehetséges, ha a bioapatitban nagy mértékű (a foszfáttartalom 16,7 %-a) CO_3^{2-} helyettesítés található. Vagyis, a 6 db PO_4^{3-} helyett csak 5 db PO_4^{3-} marad a szerkezetben:



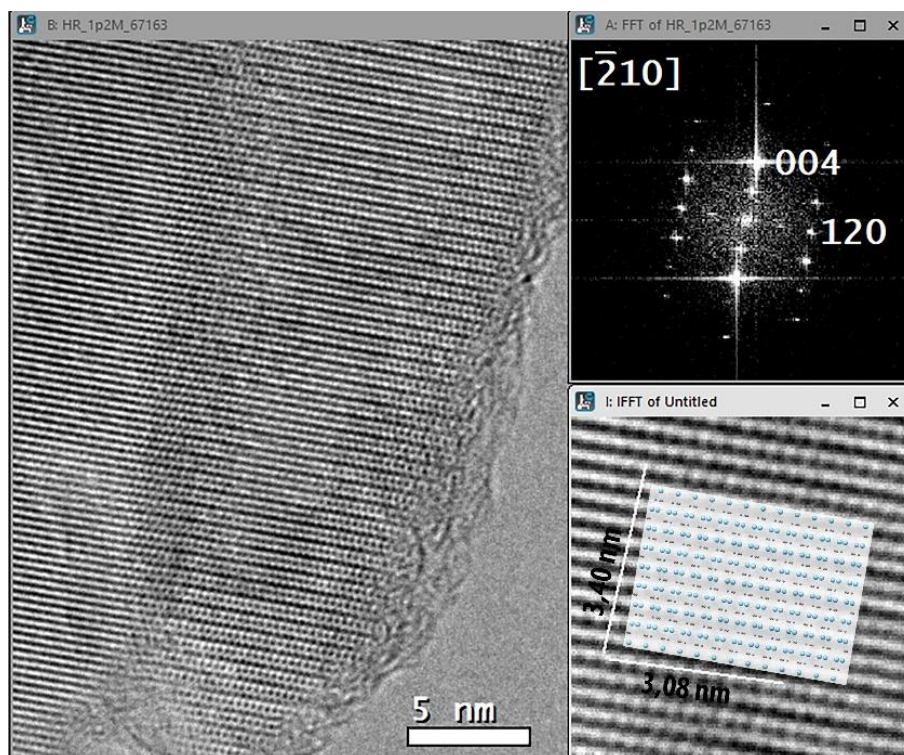
4. táblázat A kehida-fővenyesi és a kaposvári csontminták TEM-EDS eredményei és az 1 sigma

TEM – EDS	O	Na	Mg	P	Ca	Ca/P
Kaposvar_2250_1	56.23±1.32			13.54±0.60	29.14±1.50	2.15
Kaposvar_2250_2	58.00±1.17		0.16±0.03	13.97±0.56	27.32±1.36	1.96
Kaposvar_2250_3	57.48±1.20		0.26±0.05	13.67±0.56	28.17±1.41	2.06
Kaposvar_2250_4	57.89±1.17			13.52±0.54	28.17±1.40	2.08
Kaposvar_2250_5	52.01±1.07			15.83±0.62	32.16±1.54	2.03
Kaposvar_2250_6	60.82±1.26	0.42±0.04	0.21±0.04	13.08±0.54	24.21±1.25	1.85
Kaposvar_2250_7	62.51±1.33			13.17±0.56	24.11±1.26	1.83
Átlag:	57.85	0.42	0.21	13.83	27.61	2.00
TEM – EDS	O	Na	Mg	P	Ca	Ca/P
Kehida_1	52.64±1.10		0.22±0.04	15.28±0.61	31.29±1.52	2.05
Kehida_2	50.42±1.06		0.31±0.05	15.82±0.64	32.70±1.54	2.07
Kehida_3	58.16±1.18		0.30±0.05	13.92±0.55	26.55±1.30	1.91
Kehida_4	58.51±1.20		0.33±0.05	12.73±0.51	27.93±1.36	2.19
Kehida_5	55.05±1.14	0.07±0.01	0.50±0.03	14.27±0.56	28.33±1.42	1.99
Kehida_6	53.67±1.05		0.18±0.02	14.76±0.59	30.87±1.47	2.09
Átlag:	54.74	0.07	0.31	14.46	29.61	2.05

A sztöchiometria megmaradása miatt a $\text{PO}_4^{3-} - \text{CO}_3^{2-}$ helyettesítés csatolt elemhelyettesítéssel (O^{2-} az $(\text{OH})^-$, vagy Na^+ a Ca^{2+} helyén) vagy pedig Ca vakanciával kell, hogy együttjárjon (lásd *Apatit* fejezetben). A TEM-EDS eredmények alapján a CO_3^{2-} és $\text{O}^{2-} - (\text{OH})^-$ helyettesítésen túl lényegében más helyettesítés nincsen a bioapatitban. Vakancia lehetséges a Ca(I), Ca(II) és a csatornakitöltő F pozíciókban. Ha a Ca(I) vagy Ca(II) pozíciókban lenne helyettesítés, az csökkentené a Ca/P arányt, ami ellentétes a mért adatokkal. Ezek közül a csatornapozícióban való oxigén erősíti a Ca/P arány, illetve a kehida-fővenyesi minta esetén a HRTEM képből számolt FFT mutatta szimmetriacsökkenés is. Ha a $00l$ reflexióknál az $l=2n$ kioltási szabályt tapasztalunk, akkor a vizsgált apatit legalább $P6_3$ -as szimmetriájú. A HRTEM alapján számolt Fourier-transzform $[010]$ vetületű, ahol a^* és c^* irányok láthatóak. Mivel a $l=2n+1$ Fourier-komponensek megjelennek az FFT-n, így a c -tengely irányú 6_3 gír sérül, ez alacsonyabb szimmetriát bizonyít. Korábbi munkánk alapján valószínűsíthető [27], hogy a csatornakitöltő F pozícióban nem OH^- , hanem O^{2-} van. Így a $\text{PO}_4^{3-} - \text{CO}_3^{2-}$ helyettesítés következtében kialakult +1 töltés is kiegyenlítésre kerül, a kristály sztöchiometrikus. A kristály lehetséges tércsoportjai: $P\bar{3}$ vagy $P\bar{6}$.



10. ábra A kechida-fövenyesi minta BF (bal) és HRTEM (jobb) felvétele

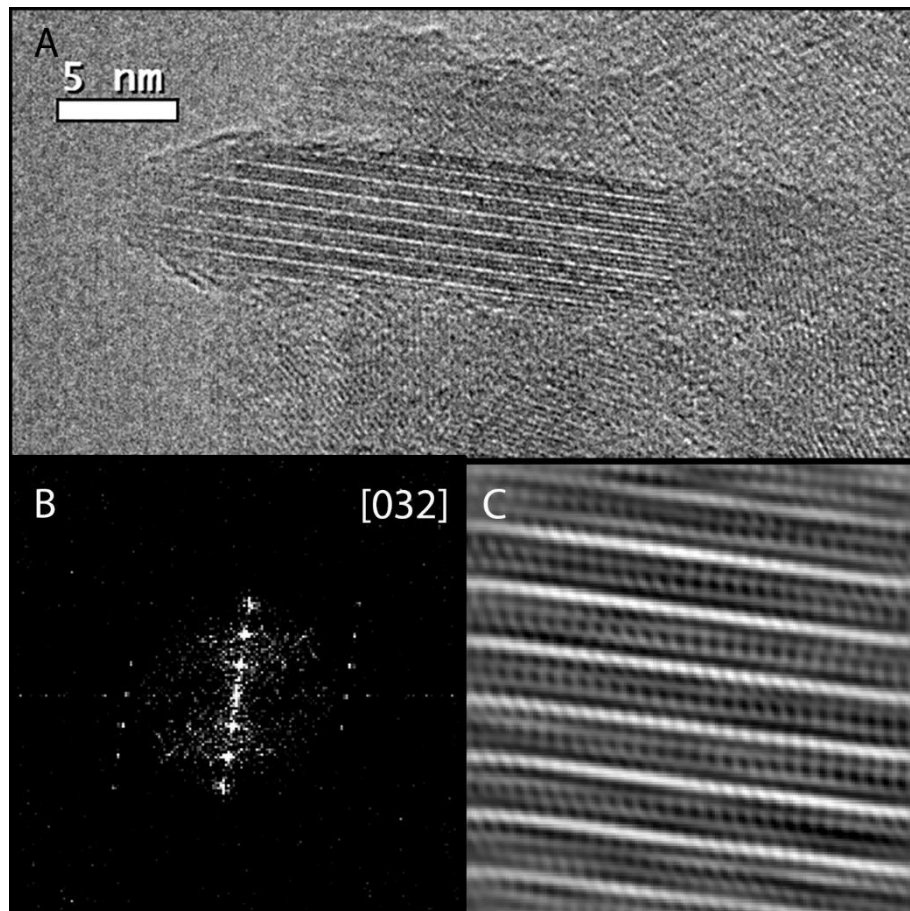


11. ábra A kechida-fövenyesi minta HRTEM felvétele (bal), FFT-ja (jobb fent) és IFFT-ja (jobb lent)

A kaposvári minta HRTEM képeinek Fourier-transzformján – a kis szemcseméret – nem mérhettünk $l=2n+1$ reflexiót. Azonban, a kémiai összetétel alapján feltételezhető, hogy a 2,00 átlagos Ca/P arány a kechidafövenyesi mintánál leírtakhoz hasonló szerkezetre utal.

A kaposvári mintákban megfigyelt bioapatit krisztallitok mérete és alakja igen hasonló az áztatásos kísérlet során megfigyelt bioapatit krisztallitokéhoz (lásd *Áztatásos*

kísérlet fejezetben). A bioapatit kristályoknak nincs éles határuk, ami utalhat reszorbeálódásra.



12. ábra A kaposvári minta egy $[032]$ vetületű krisztallitjának HRTEM felvétele (a,) FFT-ja (b) és IFFT-ja (c)

A fenti vizsgálatok alapján a régészeti daganatos betegségben átalakult csontminták ásványtani jellemzésére a következő megállapításokat tehetjük:

1. A kehida-fővényesi mintában vizsgált bioapatit méretében nagyobb, a kaposvári mintában vizsgált bioapatit méretében kisebb, mint az egészséges csontokban mérhető bioapatit.
2. Kémiai összetételükben a két minta igen hasonló, átlagban 2.05 és 2.00 Ca/P arány mérhető, ami szintén eltér az egészséges csontban található 1.53-1.67 Ca/P aránytól.
3. Mindkét mintában B-típusú CO_3^{2-} helyettesítés van, ami oxigén helyettesítéssel jár a csatornakitöltő F pozícióban. Erre utal a szimmetriacsökkenés is.

4. $P6_3/m$ tércsoportból kiindulva a $00l=2n$ kioltási szabály sérül, így a lehetséges szimmetria $P\bar{3}$ és $P\bar{6}$ -ra redukálódik.

Tervezzük a kehida-fővényesi és a kaposvári minták további vizsgálatát transzmissziós elektronmikroszkópiával és röntgen-pordiffrakcióval.

Áztatásos kísérlet

A karbonát – foszfát átalakulása már ismert jelenség, amiről úgy vélték, hogy irreverzibilis folyamat. Ha a kiindulási anyag aragonit (CaCO_3 , rombos, $Pmcn$ tércsoport), enyhén savas, foszfátos oldatban áztatva HAp képződik [68]. Ebben a tanulmányban nem szilárdfázisú átalakulást figyeltek meg, hanem két lépcsőben, egymást követve oldódást és kicsapódást.

Savakban történő HAp oldódásról több publikáció is született, melyeket Dorozkhin 2012-ben [69] foglalt össze. Számos elképzelés létezik a HAp oldódásáról, azonban annak tényleges mechanizmusa mindig a környezettől függ. Az oldódást befolyásoló két legfontosabb paraméter a pH érték és a hőmérséklet [53],[54]. Sajnos a legtöbb HAp oldódásáról készült fázisdiagram magas (600 °C feletti) hőmérséklet tartományban kezdődik, ami geológiai szempontból releváns, biológiai szempontból viszont kevésbé szerencsés.

Dorozkhin összefoglaló munkáján kívül csupán néhány tanulmány jelent meg HAp oldási kísérletekről lúgos folyadékokban [70] és még kevesebb a bioapatit lúgos áztatásáról [72]. Oldódás szempontjából a FAp a legstabilabb, míg az amorf Ca-foszfát (ACP) a legkevésbé stabil anyag. A bioapatit oldódási tulajdonságainak megértése fontos a biológia, a földtudományok, valamint az orvostudományok számára is [1],[16],[19],[30],[55]. A karbonát mennyiségének fontos szerepe van az apatit szerkezetében, mivel a karbonát-helyettesítés elősegíti a sejtek abszorpcióját és proliferációját, így megnő az esély a daganatos elváltozások kialakulására [73].

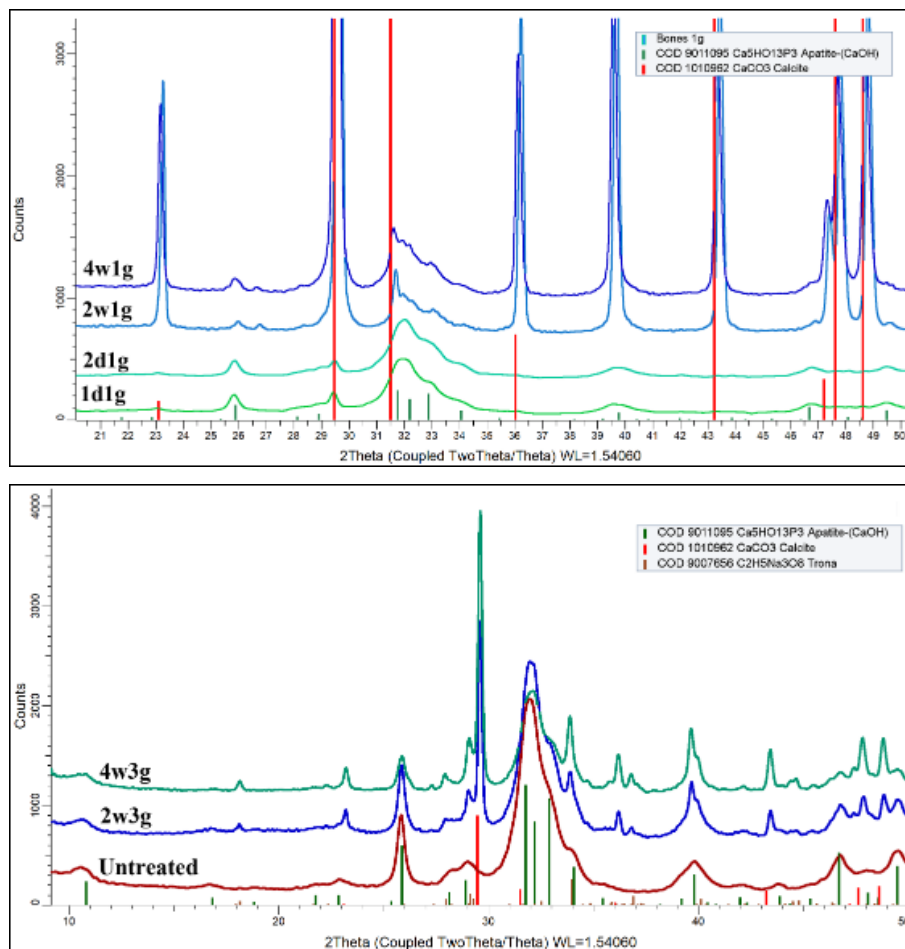
Kísérleteink során karbonátos oldatban marhacsontot áztattunk. Az áztatási idő és a csont mennyiségének változtatásával figyeltük a foszfát – karbonát átalakulás végbemegy-e, és ha igen, milyen sebességgel és lépésekben? A tömény karbonátos oldatot NaHCO_3 (nahkolit) desztillált vizes oldásával állítottuk elő. Az oldatok enyhén lúgosak (pH 7,6-8) és az áztatás során a pH értékek nem változtak. Az áztatás minden esetben zárt üvegedényben történt.

1 g illetve 3 g bioapatitot áztattam 1 liter oldatban. Az 1g minták esetén az áztatási idő 1 nap és 4 hét között változott. 3 g mintáknál 2 hét – 8 hét volt az áztatási idő. Az áztatást követően a mintákat centrifugáltam és desztillált vízzel dekantáltam (Hettich Rotina 420, 2400 rpm), majd kétszeri ismétlés után szárítószekrényben 60 °C-on kiszáritottam. Ezt követően achát mozsárban kézzel porítottam a mintákat.

Az áztatási kísérleteket a Miskolci Egyetem Ásvány-Közzettan Tanszék Üledékföldtani Laboratóriumában végeztem. A mintákat röntgen-pordiffrakciós (XRPD), elektrondiffrakciós (SAED), nagyfelbontású elektronmikroszkópiai (HRTEM) és energiadiszperzív röntgenspektroszkópiai (EDX) módszerekkel vizsgáltuk. Az XRPD méréseket a Miskolci Egyetem Műszaki Földtudományi Kar Ásványtani-Földtani Intézetében Bruker Advanced D8 diffraktométerrel (Cu-katód, Göbel-tükör, 2,5° axiális sollar, Vantec 1 helyzetérzékeny detektor, 2-70° 2 θ , 0.007° 2 θ lépésköz és 140 s gyűjtési idő) készültek, Kristály Ferenc segítségével. A transzmissziós elektronmikroszkópiai mérések a MTA Energiatudományi Kutatóközpont Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Kutatóintézetének Vékonyréteg-fizika Laboratóriumában végeztem, Kovácsné Kis Viktória segítségével. A SAED mérések Philips CM20 (200 kV, LaB₆ katód, Imaging Plate) transzmissziós elektronmikroszkóppal, a HRTEM felvételek JEOL 3010 (300 kV, LaB₆ katód, CCD kamera) transzmissziós elektronmikroszkóppal készültek.

Referencia értéként a kiindulási marhacsonthoz található bioapatitnak meghatároztam a krisztallitméretét és kémiai összetételét. A kémiai összetételre a Ca/P arányt használtam a változások indikátoraként, ami a kezeletlen marhacsonthoz esetén 1,59. A nyers csont XRPD görbéjén széles és kis intenzitású reflexiók vannak, a nanokristályos és amorf fázisok miatt. Noha a reflexiók hasonlítanak a HAp-ra, pozíciójukban és intenzitásukban különbségek vannak. A krisztallitok mérete a Scherrer-egyenlet alapján lett meghatározva, 20-30 nm hosszúak és 5-10 nm szélesek. Ez az érték valamivel kisebb, mint ami irodalmi adatokból ismert (50x25x5 nm). A HAp 002 reflexió relatív intenzitása nagy. A 010 reflexió erősen aszimmetrikus, és kis relatív intenzitással jelenik meg. A 30-35° 2 θ tartományban széles, aszimmetrikus csúcs jelenik meg, ami a HAp 4 átfedő, nagy intenzitású csúcsa. Magasabb szögtartományban további széles csúcsok vannak. A XRPD görbe kis szögeinél megjelenő háttéremelkedés a csont szerves anyagának diffúz szórása. Így Rietveld-analízissel nem lehetséges elfogadható illesztést készíteni a csontokon – HAp modell szerkezetet használva –, még a kitüntetett orientációs korrekciót (March-Dollase) és a feszültségkorrekciót követően sem.

Az áztatás során a bioapatit krisztallitok mérete csökkent (reszorbeálódott), egészen 8-9 nm-ig, és karbonát fázisok – főként kalcit – jelentek meg (13. ábra). A krisztallitméret meghatározás során ezeket az bioapatitokat „bioapatit res.”-ként jelöltük.



13. ábra 1 g(felül: 1 nap, 2 nap, 2 hét és 4 hét) és 3 g (alul: kezeletlen, 2 hét, 4 hét) áztatásos mintasorozatok XRPD felvételei. A 3 g minták mellett a kezeletlen csont (bordó) XRPD görbéje is látható.

A bioapatit méretcsökkenés mind az 1 g, mind a 3 g mintákban végbement. Azonban az 1 g mintákban normál méretű bioapatit már csak kis mennyiségben volt jelen (11,3-14,5 wt%), míg a 3 g mintákban nagyobb mennyiségben (31,2-57,6 wt%) (5. táblázat).

5. táblázat XRPD görbén megjelent reflexiók alapján számolt krisztallit méret

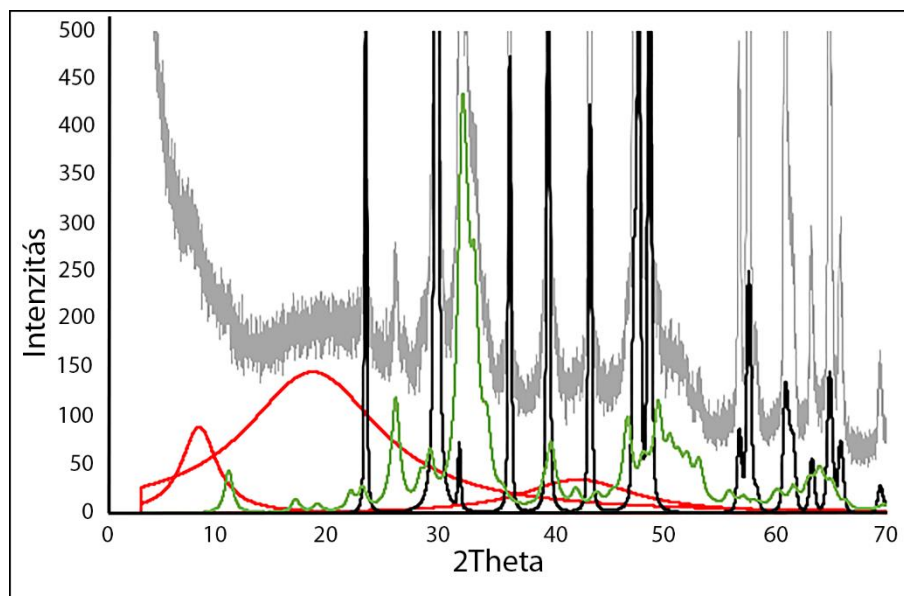
Krisztallit méret (nm)	2w1g	4w1g	2w3g	4w3g	8w3g
Kalcit mikro	8200 +/- 1800	8200 +/- 1800	-	-	-
Kalcit nano	125 +/-28	83 +/-23	93 +/-21	69 +/-15	144 +/-32
Bioapatit	-	-	22 +/-6	19 +/-5	12 +/-3
Bioapatit res.	9 +/-2	9 +/-2	9 +/-2	9 +/-2	8 +/-2
Trona	-	-	77 +/-17	139 +/-31	55 +/-12

A bioapatit méretének csökkenése után kalcitkristályok képződtek, vagyis a foszfát-karbonát átalakulás végbement. Az áztatási idő előrehaladtával a kalcit mennyisége, és mérete növekedett (5. táblázat). A kalcit nagyméretű, 1800-8200 nm saját alakú, rombos kristályok formájában jelenik meg mint a karbonátképződés végterméke. Az 1 g mintákban már 1 napos áztatás után megjelent a kalcit, 2 hét után pedig jelentős a képződött kalcit mennyisége (6. táblázat).

6. táblázat Rietveld-analizissel végzett mennyiségi meghatározás eredményeit összefoglaló táblázat

Rietveld (wt%)	2w1g	4w1g	2w3g	4w3g	8w3g
Kalcit	67.7	59.5	11.9	23.6	27.3
Bioapatit	11.3	14.5	57.6	43.7	31.2
hidratált nanokristályos Ca-karbonátok	21.0	26.0	25.0	19.0	33.0
Trona (Na₃(CO₃)(HCO₃).2(H₂O))	-	-	5.6	13.7	8.5

A kalcitokat is elkülöníthatjuk méret szerint. A 3 g mintasorozatban ugyanis nem képződött mikrométer nagyságú kalcitkristály, azokban a mintákban 69-144 nm méretű krisztallitok voltak. A mennyiségi meghatározás során elkülönítettük egy hidratált nanokristályos Ca-karbonát fázist is, ami jelentős háttéremelkedésként volt jelen az XRPD görbéken. Ez a fázis tekinthető a karbonátképződés első fázisának (14. ábra).



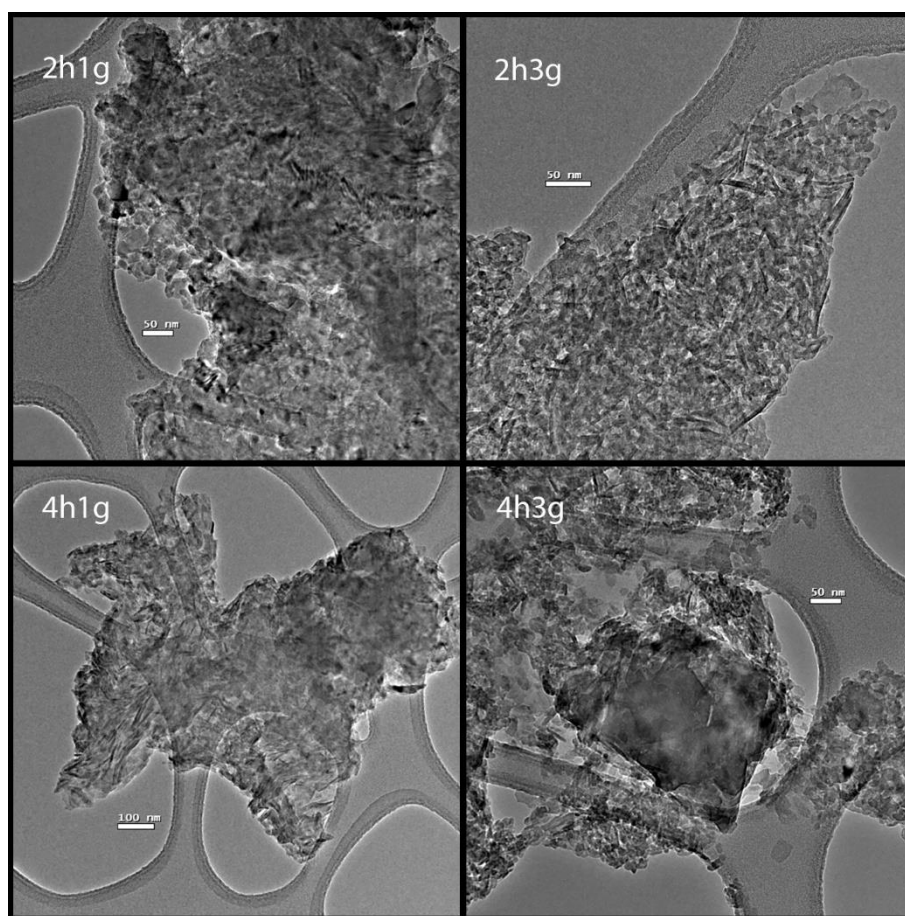
14. ábra Hidratált nanokristályos Ca-karbonát fázis(ok) (piros) okozta háttéremelkedés a 2h3g minta XRPD felvételén (szürke). Kalcit (fekete), Bioapatit (zöld)

A 3 g áztatásos mintákon mért TEM-EDS eredményekből jól látszik, hogy az idő elteltével hogyan növekszik a Ca/P arány, 2hét/3g mintában 1,88, majd 4hét/3g mintában már 2,18 (7. táblázat). Az áztatás során a P koncentrációja csökken, míg a Ca-é növekszik. Ez mutatja a PO_4^{3-} - CO_3^{2-} helyettesítés mértékét. Az 1 g mintákban nem tudtunk kémiai elemzést végezni bioapatit kristályokon, mivel azok mérete és mennyisége ezt már nem tette lehetővé. Elemhelyettesítésként, minor (≈ 1 at%) elemként Na és Mg volt mérhető.

7. táblázat Az áztatásos kísérlet TEM-EDS eredményei, a különböző fázisokra 7-11 mérési pont alapján számolt átlagok

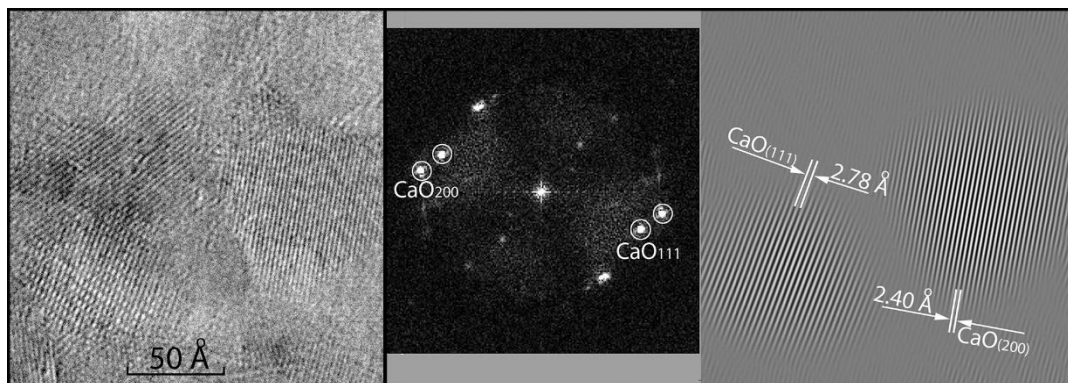
TEM-EDS		O	Na	Mg	P	Ca	Ca/P
Normal	Bioapatit	62.33	n.d.	0.60	14.00	22.29	1.59
2hét1g	Kalcit	65.64	n.d.	0.83	0.34	32.51	
4hét1g	Kalcit	67.95	n.d.	0.94	0.37	30.00	
2hét3g	Kalcit	70.25	0.76	1.80	2.73	24.31	
	Bioapatit	57.66	3.22	0.44	13.15	24.77	1.88
4hét3g	Kalcit	60.63	2.12	1.40	4.10	31.86	
	Bioapatit	56.19	3.64	0.36	12.16	26.46	2.18

A TEM vizsgálatok megerősítették az XRPD által mért méret és alak eredményeket. Az XRPD görbék alapján hidratált nanokristály Ca-karbonát fázisnak értékelt krisztallitok a BF és HRTEM felvételeken 10-20 nm átmérőjű szemcsékként jelentek meg (15. ábra).



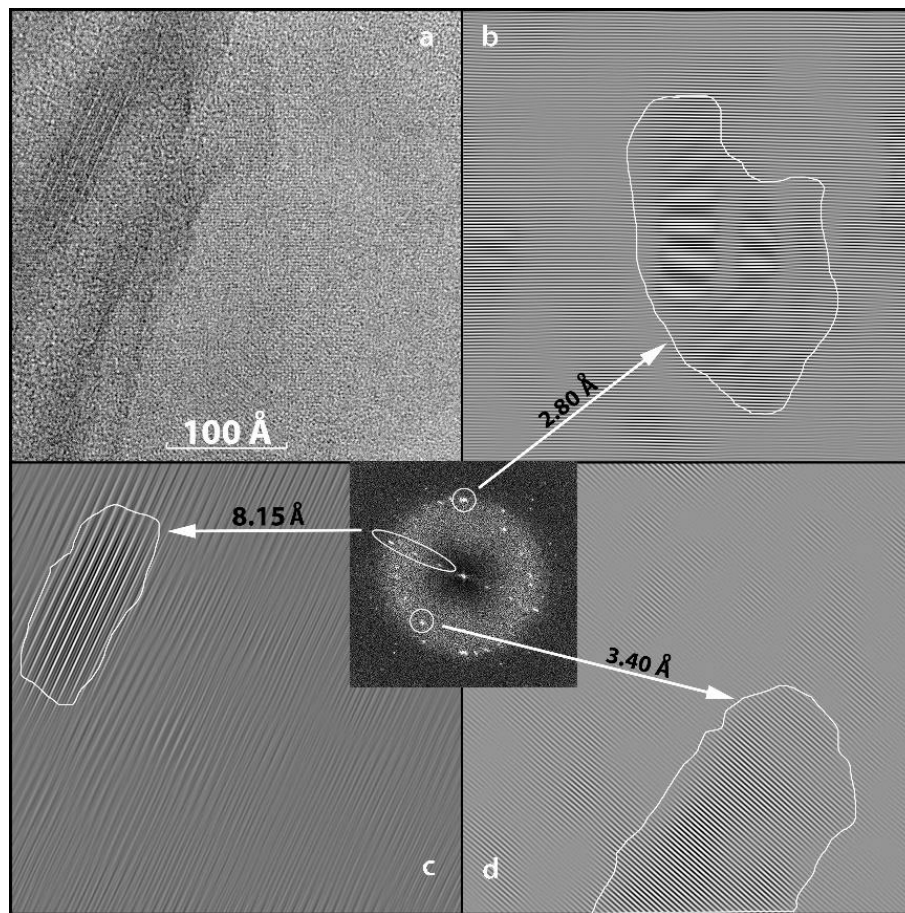
15. ábra Az áztatásos kísérlet mintái: 2 hét 1 g (bal fent); 2 hét 3 g (jobb fent); 4 hét 1 g (bal lent); és 4 hét 3 g (jobb lent)

Ezek a kristallitok azonban sugárérzékenyek, így az FFT alapján mindig CaO -ként azonosíthatóak (16. ábra). Az önálló CaO kristallitokon mérve, a $\text{CaO}_{(111)}$ és $\text{CaO}_{(200)}$ periódusok jelentek meg. Az 1 g mintákban a nanométeres Ca -karbonát szemcsék között néhol még található bioapatit, ami erősen reszorbeálódott.

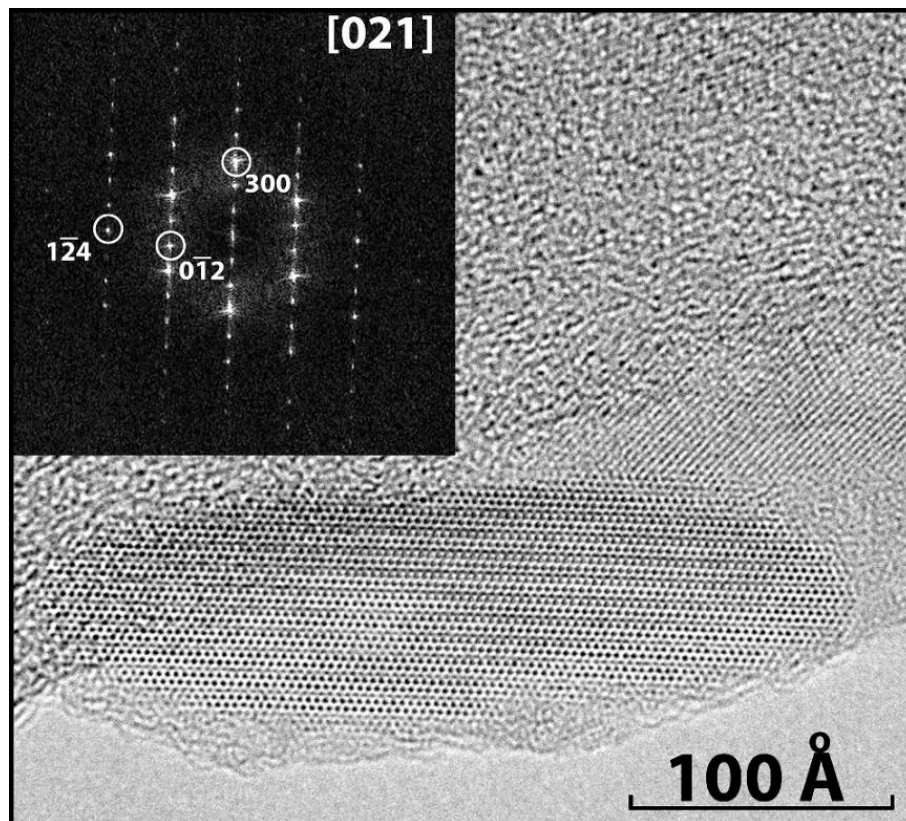


16. ábra CaO kristallitok (bal) FFT (középen) és IFFT (jobb)

Az áztatás hatására a bioapatit kristallitoknak nincs határozott pereme. A kristallitok alakja többnyire tűs, táblás, az 1 g mintákban 10-25 nm hosszú és 5-8 nm széles méretben, a 3 g mintákban kissé nagyobb, 30-40 nm hosszú és 8-10 nm széles. A szemcsék FFT-ján a HAp (010), (210) és (002) reflexiói jelennek meg (17. ábra). A 4h3g mintában vizsgált bioapatit [021] vetületű és kivételesen jó állapotban maradt meg (18. ábra).



17. ábra Áztatás utáni bioapatit (a,) és FFT-ből számolt rácsképei, 2,80 Å (211) (b), 8,15 Å (100) (c) és 3,40 Å (002) (d)



18. ábra Bioapatit krisztallit HRTEM képe és számolt FFT-je. Jól látható, hogy a krisztallit közel 40 nm hosszú és 10 nm széles, kerekített táblás megjelenésű

Az áztatásos kísérlet során vizsgált bioapatit ásványtani jellemzésére a következő megállapításokat tehetjük:

1. Látható, hogy a PO_4^{3-} - CO_3^{2-} átalakulás nem szilárd fázisú átalakulásként megy végbe, hanem oldódás-kicsapódásként, hasonlóan a CO_3^{2-} - PO_4^{3-} átalakuláshoz [68].
2. A bioapatit CO_3^{2-} telített vizes oldatban a kísérleti eredmények alapján a lejátszódó foszfát-karbonát átalakulási folyamatot a következő lépésekre bonthatjuk:
 - I. elemhelyettesítés növekedése
 - II. az apatitszerkezet felbomlása
 - III. karbonátképződés.
3. A megnövekedett CO_3^{2-} helyettesítés következtében a bioapatit oldhatósága nőtt. Mivel az oldat CO_3^{2-} telített volt, így a bioapatit oldásából felszabadult Ca karbonátként kikristályosodott.

Hőkezelés

A csontokban hőkezelésre végbemenő változásokat már sokan vizsgálták [74]–[77]. Korábbi tanulmányok alapján ismerjük, hogy 450-500 °C környékén a csontok szervesanyaga elég, így afeletti hőmérsékleteken már „tisztán” a szervesetlen bioapatit átalakulása vizsgálható. A csontok viselkedése a hőmérséklet emelkedésére szintén fontos kutatási terület számos tudományág számára. Geológiai szempontból a fosszilizáció során elszenvedett hőhatás, archeológiai szempontból pedig a hamvasztásos temetkezések égetési hőmérsékletére lehet következtetni, ugyanis a használt hamvasztási módszerek (kultúrának megfelelően) eltérőek voltak. Az apatitszerkezet 1100-1200 °C-ig stabil, ennél magasabb hőmérsékleten a szerkezet felbomlik CaO-ra és α -TCP-ra (trikalcium foszfát, whitlockit, $\text{Ca}_9[(\text{PO}_4)_6]$).

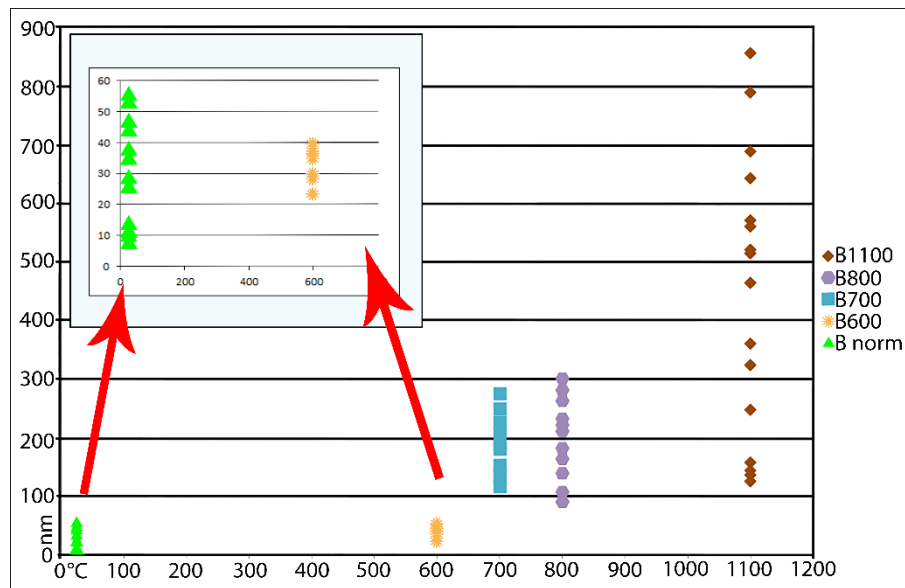
A hőkezelési kísérleteket a Miskolci Egyetem Ásvány-Kőzettan Tanszék Üledékföldtani Laboratóriumában végeztem. A mintákat röntgen-pordiffrakciós (XRPD), elektrondiffrakciós (SAED), nagyfelbontású elektronmikroszkópiai (HRTEM) és energiadiszipatív röntgenspektroszkópiai (EDX) módszerekkel vizsgáltuk. Az XRPD méréseket Miskolci Egyetem Műszaki Földtudományi Kar Ásványtani-Földtani Intézetében Bruker Advanced D8 diffraktométerrel (Cu-katód, Vantec 1 helyzetérzékeny detektor) és Bruker Discover D8 Da Vinci diffraktométer (Cu-katód, LYNXEYE detektor, 0D mód, Göbel tükör 2,5° primer és 0,2° sekunder soller, 2-70° 2 θ , 0,01° 2 θ lépésköz és 0,2 s gyűjtési idő) készültek, Kristály Ferenc segítségével. A hevítést a diffraktométer Anton Paar HTK 1200N fűthető kamrájában végeztük, 10 °C/perc fűtési sebességgel. Derivatográfus méréseket végeztünk egy MOM Derivatográf-C készüléken, levegő atmoszférán, 10 °C/perc fűtési sebességgel, 1100 °C-ig. A transzmissziós elektronmikroszkópiai mérések a Magyar Tudományos Akadémia Energiakutató Központ Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Kutatóintézetének a Vékonyréteg-fizika Laboratóriumában végeztem, Kovácsné Kis Viktória segítségével. A SAED és EDS mérések Philips CM20 (200 kV, LaB₆ katód, Imaging Plate) transzmissziós elektronmikroszkóppal, a HRTEM felvételeket FEI Titan – THEMIS 80-200 keV (200 kV, LaB₆ katód, CCD kamera) transzmissziós elektronmikroszkóppal készültek.

A hevítést – hasonlóképpen az áztatási porított mintákhoz – marhacsonton végeztem. Így a kiindulási méret és kémiai összetétel adatok azonosnak tekinthetők. Derivatográfus vizsgálat során a marhacsont tömegének közel 23%-át veszítette el 930

$^{\circ}\text{C}$ -ig való hevítés során, ami csontok esetében normális. A TG görbe három különböző régióra bontható: első régió a szobahőmérséklettől tart 227°C -ig, a második régió 227 – 540°C között és a harmadik régió 540°C felett van. A legintenzívebb tömegvesztés a második régióban történik, közel 12%. Ennek oka, hogy ezen hőmérséklettartományban a legintenzívebb a szerves anyag bomlása, átalakulása. A szerves anyag bomlása 540°C -ig érdemben befejeződik [74], [77]–[79]. Ez a folyamat már az első régió végén elkezdődik, és a harmadik régió elejéig tart. 800°C -ig a bioapatitban jelen lévő B-típusú CO_3^{2-} helyettesítés is teljesen elbomlik CO_2 gázzá. Irodalmi adatok alapján, szintetikus apatitban a B-típusú helyettesítés 600°C -ig stabil [1]. Ezek alapján a szerves anyag mentes, bioapatit kristallitokkal 600°C felett lehetséges érdemben foglalkozni.

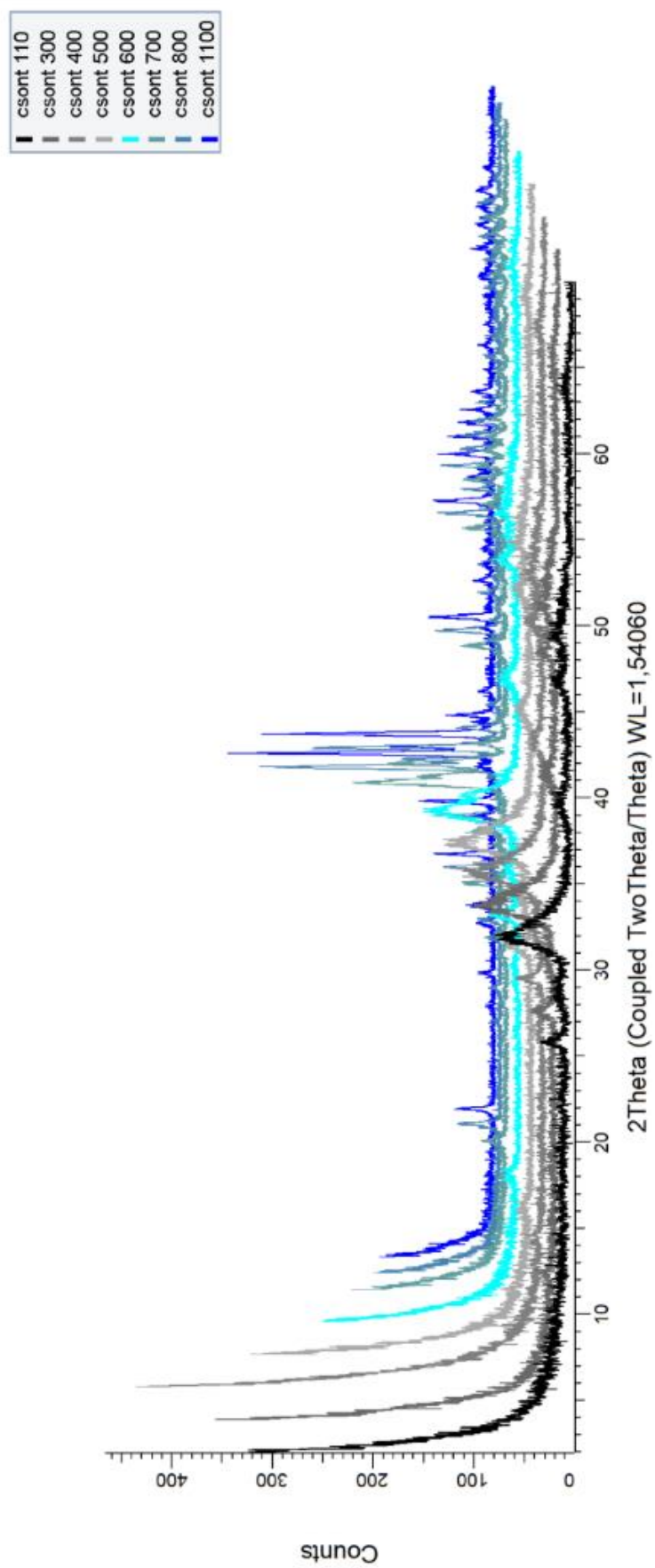
A Bruker D8 Da Vinci röntgen diffraktométer fűthető kamrájával hevítéssel sorozatot készítettünk. Az alábbi hőmérsékleteken történtek XRPD mérések: 25°C , 110°C , 300°C , 350°C , 400°C , 450°C , 500°C , 550°C , 600°C , 650°C , 700°C , 750°C , 800°C , 1100°C , és hűtésben 1000°C , 900°C , 800°C , 600°C , 300°C és 100°C .

Szobahőmérsékleten a marhacsont XRPD görbájén széles, alacsony intenzitású reflexiók jelentek meg, az áztatásos kísérletnél leírthoz hasonlóan. A HAp 010 reflexiója aszimmetrikus és igen kis intenzitású. A reflexió csúcsaszimmetriája 300°C -tól csökken. A hevítés során a XRPD görbék háttéremelkedése – amit a szerves anyag tartalom okoz – csökken, más változás azonban 600°C -ig nem észlelhető. A kristallitok méret- és alakváltozását követve is a 600°C mutatkozik éles határnak. A Scherrer-egyenlet alapján meghatározott kristallitok mérete nem növekszik 600°C -ig, azonban a HAp 001 irányú megnyúlása mérséklődik, a kristallitok izometrikus gömbökké alakulnak át (átmérőjük 30 – 40 nm) (19. ábra).

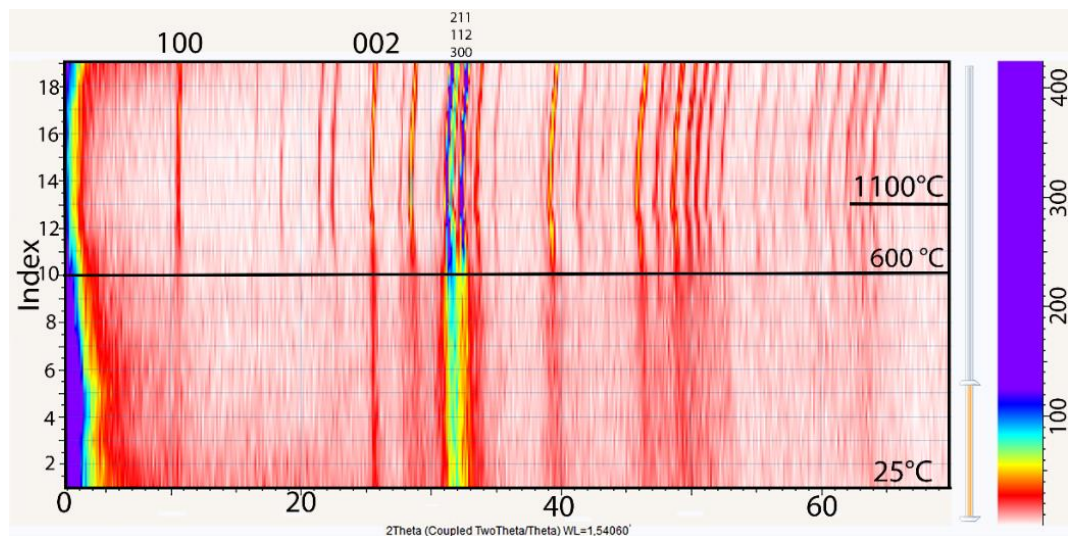


19. ábra A hevítés hatására bekövetkezett méretváltozás: Bnorm – hőzeletlen minta; B600 – 600°C-ra hevített minta; B700 – 700°C-ra hevített minta; B800 – 800°C-ra hevített minta; B1100 – 1100°C-ra hevített minta

600 °C felett a kristallitok méretnövekedése és alakváltozása figyelhető meg. Az XRPD görbéken egyre több apatit-reflexió jelenik meg, a már látható csúcsok kiszélesedése csökken (20. és 21. ábra). 700 és 800 °C-on közel 100-300 nm nagyságú apatit kristallitok vannak. 800 °C-ra a 001 irányú megnyúltság teljesen megszűnik, a megjelenő reflexiók intenzitásaránya alapján izometrikus, saját alakú kristallitok képződtek. További hevítés hatására a kristallitok mérete erősen differenciálódik, 1100 °C-on 100-950 nm közötti mérettartományban vannak.

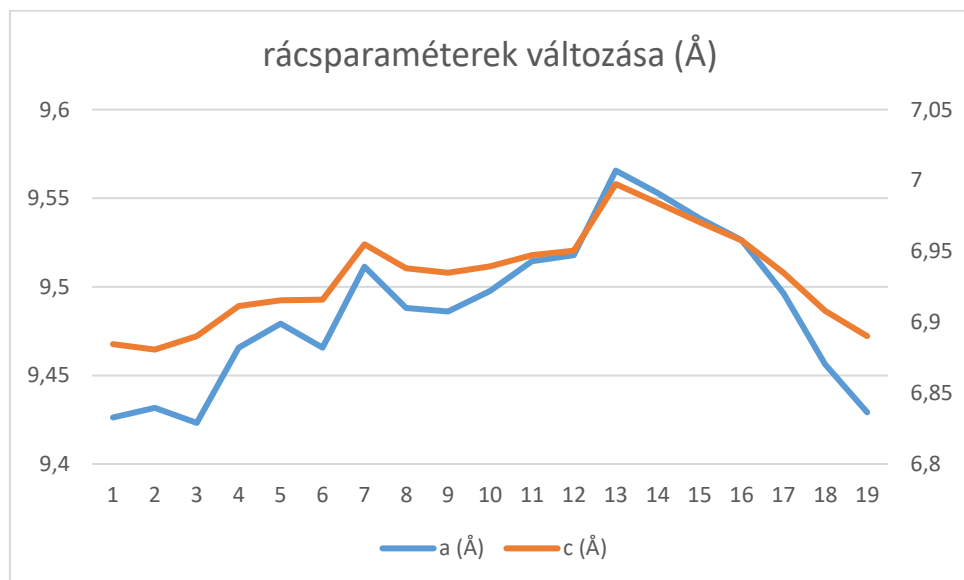


20. ábra A hevítéses sorozat XRPD görbéi 1D nézetben

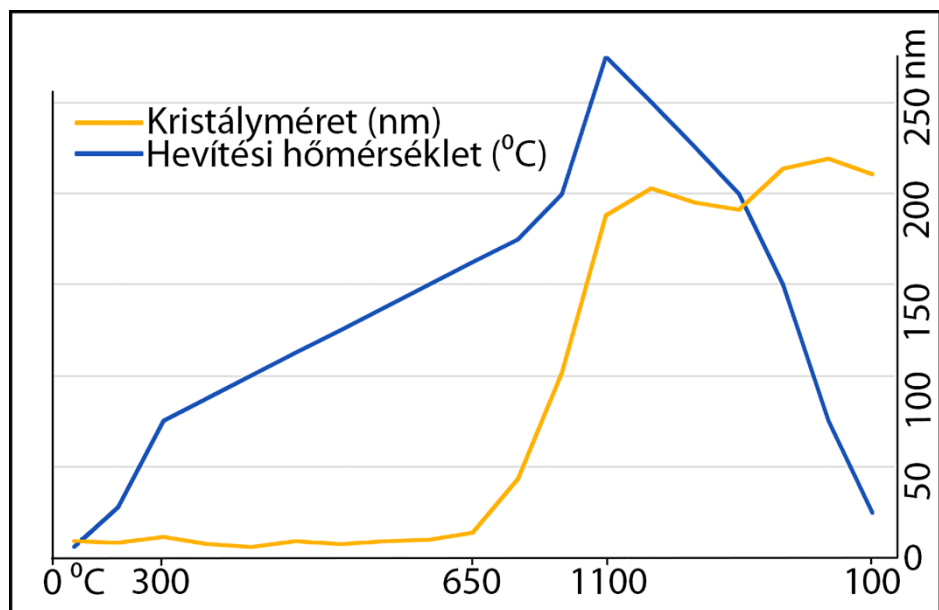


21. ábra A hevítéses sorozat XRPD görbéi 2D nézetben

Rietveld-szerkezetfinomítással nemcsak a méret és alak, hanem a szerkezeti változások is nyomon követhetők. A hevítés hatására a kristályosodáson túl az a és c tengely hossza is növekszik. A növekedés kis mértékű (0,1-0,2 Å körüli), a hőmérséklet emelkedésével közel lineáris. 1100 °C-ot követően, a hőmérséklet csökkenésével a kristallitok átlagos mérete nem változik, a rácsparaméterei viszont a kiindulási értékükre csökkentek (22. és 23. ábra, 8. táblázat).



22. ábra a és c tengely változása a hevítéses kísérlet során. Az ábra x-tengelye a minta sorszáma, amik a fentebb felsorolt hőmérsékletekhez tartoznak

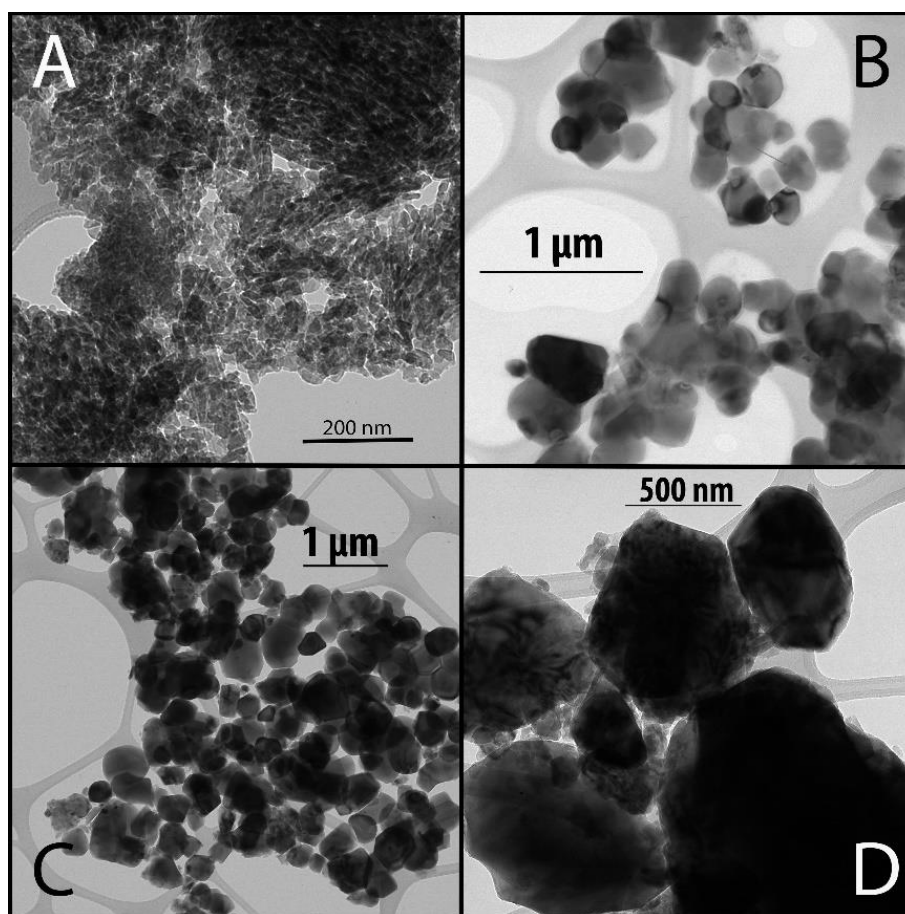


23. ábra Az átlagos kristallitméret változása a hevítési hőmérséklet függvényében

8. táblázat A hőmérséklet emelkedésével bekövetkező rácsparaméter változás és kristallitméret növekedés

Hevítési hőmérséklet (°C)	a (Å)	c (Å)	kristálméret (nm)
25	9.4263	6.8845	9.9
110	9.4316	6.8807	9.3
300	9.4232	6.8901	12.9
350	9.4656	6.9115	8.5
400	9.4792	6.9155	6.7
450	9.4656	6.9160	10.0
500	9.5113	6.9551	8.1
550	9.4881	6.9381	9.7
600	9.4861	6.9348	11.2
650	9.4976	6.9394	15.5
700	9.5144	6.9474	47.3
800	9.5179	6.9504	110.8
1100	9.5656	6.9975	205.4
1000	9.5530	6.9842	221.5
900	9.5386	6.9706	213.1
800	9.5263	6.9578	208.8
600	9.4963	6.9348	232.8
300	9.4562	6.9080	239.4
100	9.4291	6.8903	229.3

Transzmissziós elektronmikroszkópos módszereket használtunk a 600 °C, 700 °C, 800 °C és 1100 °C-os minták vizsgálatára. A kristallitokméret és alakváltozását megerősítik a TEM világos látóterű (BF) felvételek. További információként a kristallitok textúrája is vizsgálhatóvá válik. 600 °C-on bár az eredetileg tűs, táblás kristallitok lekerekedtek, a rendeződésükben még felismerhető az eredeti csontszövet. Ez a textúra azonban a további hevítés hatására megszűnik, láthatóan 800 °C-ra közel azonos méretű és formájú kristallitokká alakul át (24. ábra).



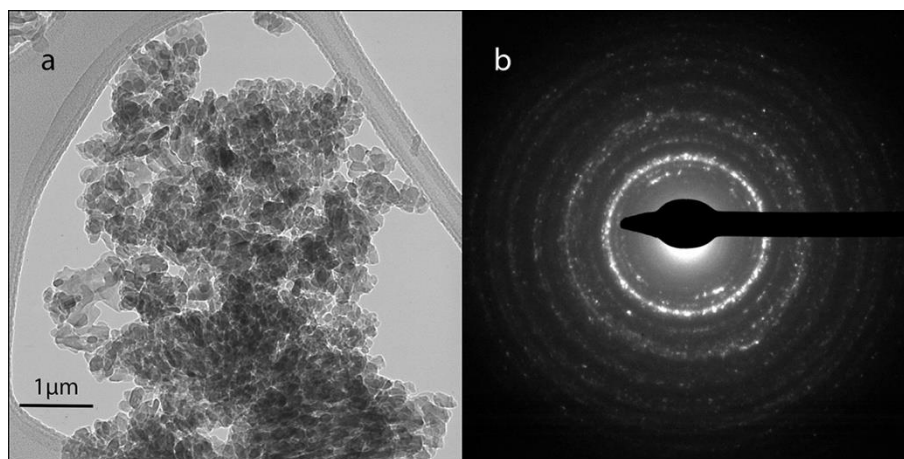
24. ábra A hevítési kísérlet: A, 600 °C-on látható még az eredeti csontszövet szerinti rendeződés B, 700 °C C, 800 °C-on közel azonos méretű, kerek kristallitok vannak és D, 1100 °C

A TEM-EDS eredmények alapján a hevítés során átlagosan $1,64 \pm 0,02$ Ca/P számolható (táblázat). Ez az érték közel azonos az ideális apatitban lévő 1,67 Ca/P arányhoz. A legnagyobb eltérés a kiindulási csontban mért 1,59 érték, 600 °C-on már 1,64-re módosul ez az arány, ami közel állandónak bizonyul a kísérlet további részében. A minimális emelkedés oka lehet, hogy az apatitban B-típusú CO_3^{2-} helyettesítés 600 °C-ig stabil, efeletti hőmérsékleten a szerkezeti CO_3^{2-} eltávozik. A TEM-EDS elemzés során

csak Na és Mg helyettesítés ($\leq 1\text{at}\%$) volt mérhető, így a kristallitok kémiai összetétele alapján sztöchiometrikus apatitnak tekinthetőek (9. táblázat).

9. táblázat TEM-EDS eredmények a hevítéses kísérlet során vizsgált mintákról

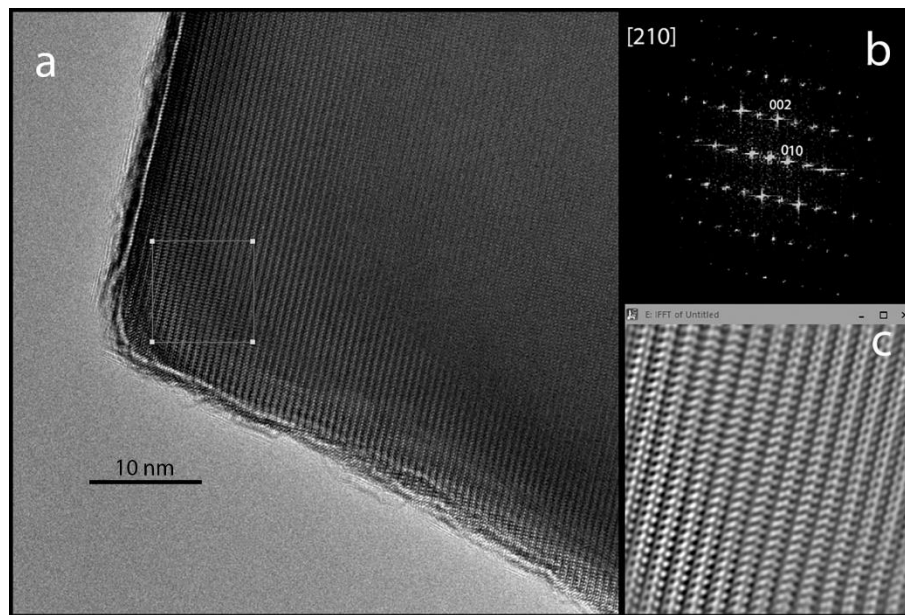
TEM – EDS	O	Na	Mg	P	Ca	Ca/P
Marha_norm1	62.51±1.32	0.69±0.08	0.66±0.05	13.82±0.51	22.32±1.18	1.62
Marha_norm2	60.82±1.28	0.87±0.09	0.58±0.05	14.42±0.54	23.32±1.21	1.62
Marha_norm3	61.52±1.30	0.68±0.05	0.64±0.05	14.58±0.57	22.58±1.22	1.55
Marha_norm4	64.46±1.33	0.91±0.10	0.51±0.04	13.18±0.51	20.95±1.19	1.59
Átlag:	62.33	0.79	0.60	14.00	22.29	1.59
Marha_600_1	55.07±1.10	0.18±0.03	0.62±0.05	14.62±0.57	29.28±1.34	2.00
Marha_600_2	60.58±1.36	0.58±0.07	0.64±0.08	14.74±0.65	23.29±1.26	1.58
Marha_600_3	59.11±1.21	0.64±0.05	0.67±0.05	15.00±0.61	24.28±1.24	1.62
Marha_600_4	59.64±1.38	0.79±0.09	0.79±0.09	14.37±0.65	24.23±1.32	1.69
Marha_600_5	57.98±1.18	0.46±0.04	0.70±0.05	15.35±0.61	25.34±1.28	1.65
Átlag:	58.48	0.53	0.68	14.82	25.28	1.71
Marha_700_1	58.94±1.20	0.23±0.03	n.d.	15.55±0.60	25.08±1.26	1.61
Marha_700_2	55.26±1.15	0.58±0.06	0.23±0.03	16.36±0.63	27.13±1.35	1.66
Marha_700_3	61.22±1.18	0.54±0.06	0.23±0.03	14.51±0.56	23.19±1.22	1.60
Marha_700_4	43.46±1.10	0.71±0.08	0.27±0.03	20.57±0.62	34.57±1.33	1.68
Marha_700_5	47.54±1.13	0.27±0.03	0.18±0.03	19.51±0.58	32.34±1.30	1.66
Átlag:	53.28	0.47	0.23	17.30	28.46	1.64
Marha_800_1	61.91±1.20	n.d.	0.25±0.03	14.29±0.55	23.17±1.25	1.62
Marha_800_2	60.47±1.20	n.d.	0.16±0.02	15.40±0.58	23.89±1.26	1.55
Marha_800_3	45.67±1.14	n.d.	0.08±0.01	20.23±0.63	33.87±1.34	1.67
Marha_800_4	62.52±1.19	n.d.	0.02±0.01	13.81±0.51	23.36±1.24	1.69
Marha_800_5	58.89±1.13	n.d.	0.02±0.01	15.53±0.54	25.45±1.27	1.64
Átlag:	57.89	n.d.	0.11	15.85	25.95	1.63
Marha_1100_1	55.66±1.15	0.18±0.03	n.d.	16.74±0.55	27.15±1.32	1.62
Marha_1100_2	58.64±1.18	0.17±0.03	n.d.	15.35±0.50	25.44±1.25	1.66
Marha_1100_3	59.43±1.21	0.13±0.02	n.d.	15.22±0.48	25.00±1.23	1.64
Marha_1100_4	57.78±1.18	n.d.	2.45±0.10	14.65±0.59	24.76±1.25	1.69
Marha_1100_5	58.96±1.22	n.d.	2.47±0.11	14.56±0.60	23.58±1.21	1.62
Marha_1100_6	57.41±1.16	n.d.	2.45±0.10	14.77±0.59	24.93±1.26	1.69
Átlag:	57.98	0.16	2.46	15.22	25.14	1.65



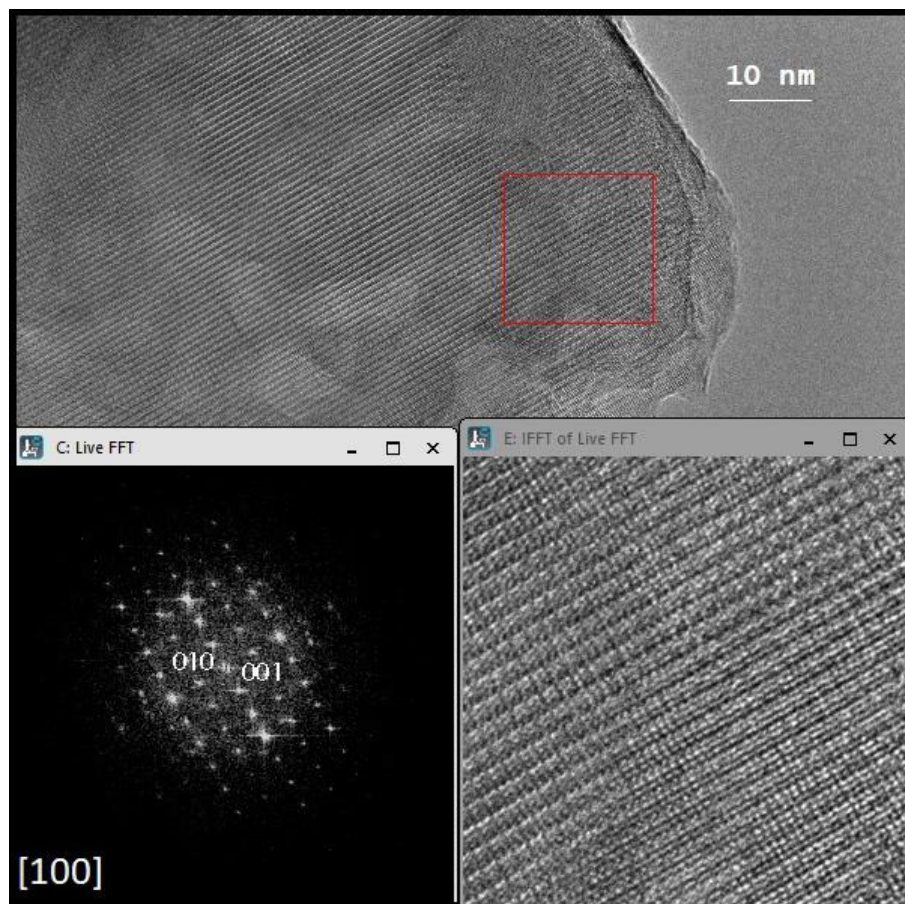
25. ábra 600 °C-ra hevített marhacsont világos látóterű (BF)(a) és területhatárolt elektrondiffrakciós (SAED)(b) felvétele

Az apatitszerkezet változása nyomon követhető a területhatárolt elektron diffrakciós (SAED) és a nagyfelbontású (HRTEM) felvételeken is. 600 °C-on a SAED felvételen még gyűrűs reflexiók jelennek meg. A 002 gyűrűn mérhető fényesedés alapján a kristallitok többsége ebbe az irányba rendeződik.

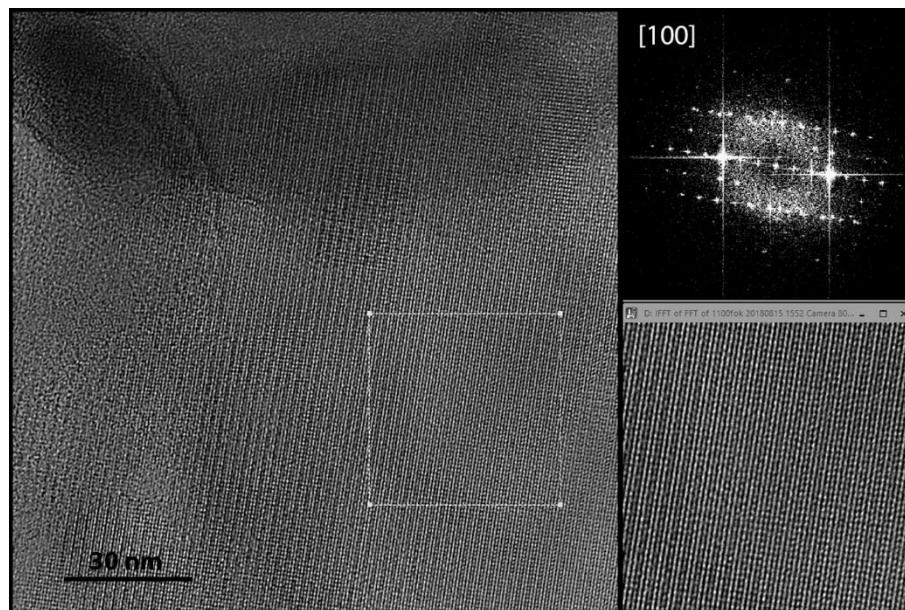
A 600 °C-ot követő kristallit-méretnövekedés a SAED felvételeken is észlelhető, ugyanis 700 °C-tól már lehetséges egykristály diffrakciós felvételek készítése. Méretbeli változás ugyan nincsen 700 °C és 800 °C között, azonban szerkezeti változás igen. 700 °C-on a $P6_3/m$ tércsoportnak megfelelően a $00l=2n+1$ reflexiók kioltásban vannak (26. ábra). 800 és 1100 °C-on azonban megjelennek a $00l=2n+1$ reflexiók is, így a 6_3 szimmetria sérül (27. és 28. ábra). Ezt igazolják a mintákról készült HRTEM felvételek is.



26. ábra 700 °C-ra hevített bioapatit HRTEM felvétele



27. ábra 800 °C-ra hevített bioapatit HRTEM felvétele



28. ábra 1100 °C-ra hevített bioapatit HRTEM felvétele

A hevítéses kísérlet során vizsgált bioapatit ásványtani jellemzésére vonatkozóan a következő megállapításokat tehetjük:

1. A hevítés hatására a csontban található bioapatit, a szerves anyag elégését követően, apatittá alakul. Ez az átalakulás 600 °C-ig megtörténik.
2. További hevítés során az apatit szerkezetben található CO_3^{2-} helyettesítés is eltűnik, a szerkezet változik.
3. A hevítés során a krisztallitok mérete 600 °C-ig nem változik, alakra izometrikus 30-40 nm-es gömbök formálódnak. 600 °C felett megindul a krisztallitok méretnövekedése, ami a hőmérséklet emelkedésével közel lineáris. A méretnövekedést a kisebb szemcsék szublimációját követően a nagyobbakra történő kicsapódással értelmezhetjük.
4. A hevítés során az apatit kristályok szerkezete is változik. Erre bizonyíték, hogy FFT-n megjelennek a $00l=2n+1$ reflexiók 800 °C felett.
5. 1100 °C-on a krisztallitok méret szerint differenciálódnak, ami előjele lehet a szerkezet felbomlásának.

Szimulációs eredmények

Amorf, illetve nanokristályos anyagok jellemzése kísérleti diffrakciós adatok alapján sok esetben nehéz. Ennek legjelentősebb oka a Bragg-reflexiók mérettől függő kiszélesedése, valamint a diffúz szórás. Ilyen esetben célszerű a vizsgálni kívánt anyagról szerkezeti modellt készíteni, és a modell szerkezetet felhasználva, diffrakciós adatkészletet (Fourier-transzformot) szimulálni. Ehhez a szükséges információk: a vizsgálni kívánt anyag kristálytani alapadatai (rácsparaméterek, tércsoport, kémiai összetétel, atomkoordináták, kristálméret és -alak, stb) – amelyek alapján felépítjük a kristályszerkezetet –, illetve a kölcsönható sugárzás (elektron, röntgen, neutron) hullámhossza, kölcsönhatás jellemzése. Ezen adatok ismeretében a számos program segítségével lehetőség nyílik egykristály, illetve pordiffrakciós felvételek szimulációjára. Az így előállított diffrakciós adatkészlet közvetlen módon is értelmezhető, összehasonlítható a rendelkezésre álló kísérleti diffrakciós adatokkal.

A szimuláció kiváló lehetőséget nyújt az ismert és ismeretlen anyagok diffrakció során megjelenő adatkészletének a modellezésére, ami nagy segítség ha az adott kristály kísérleti úton nehezen vizsgálható. *CrystalMaker* és *CrystalDiffraction* programok segítségével négy egyedi szerkezetű apatit kristályt szimuláltunk, az alábbi kérdésekre keresve választ.:

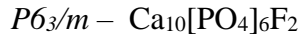
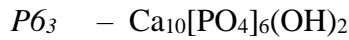
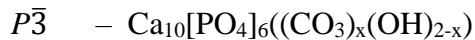
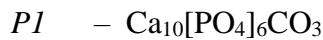
- Milyen hatással van a kémiai összetétel változása a diffrakciós adatkészletre?
- Miképpen különíthetők el a hasonló szerkezetű anyagok diffrakciós adatok alapján?

Ennek vizsgálatára elektron egykristály és röntgen-pordiffrakciós felvételeket szimuláltam apatitszerkezetekre [001] és [210] irányok szerint. A használt apatitszerkezetek adatait a 10. táblázatban szedtem össze:

10. táblázat $P1$ [80] $P\bar{3}$ [81] $P6_3$ [82] és $P6_3/m$ [83] tércsoportú apatit rácsparaméterei.

	$P6_3/m$	$P6_3$	$P\bar{3}$	$P1$
$V (\text{\AA}^3)$	527.1	526.8	539.5	546.0
a	9.39	9.41	9.52	9.58
b	9.39	9.41	9.52	9.76
c	6.90	6.87	6.87	6.88
α	90	90	90	89.28
β	90	90	90	89.83
γ	120	120	120	121.92

A szerkezetek kémiai összetétele:



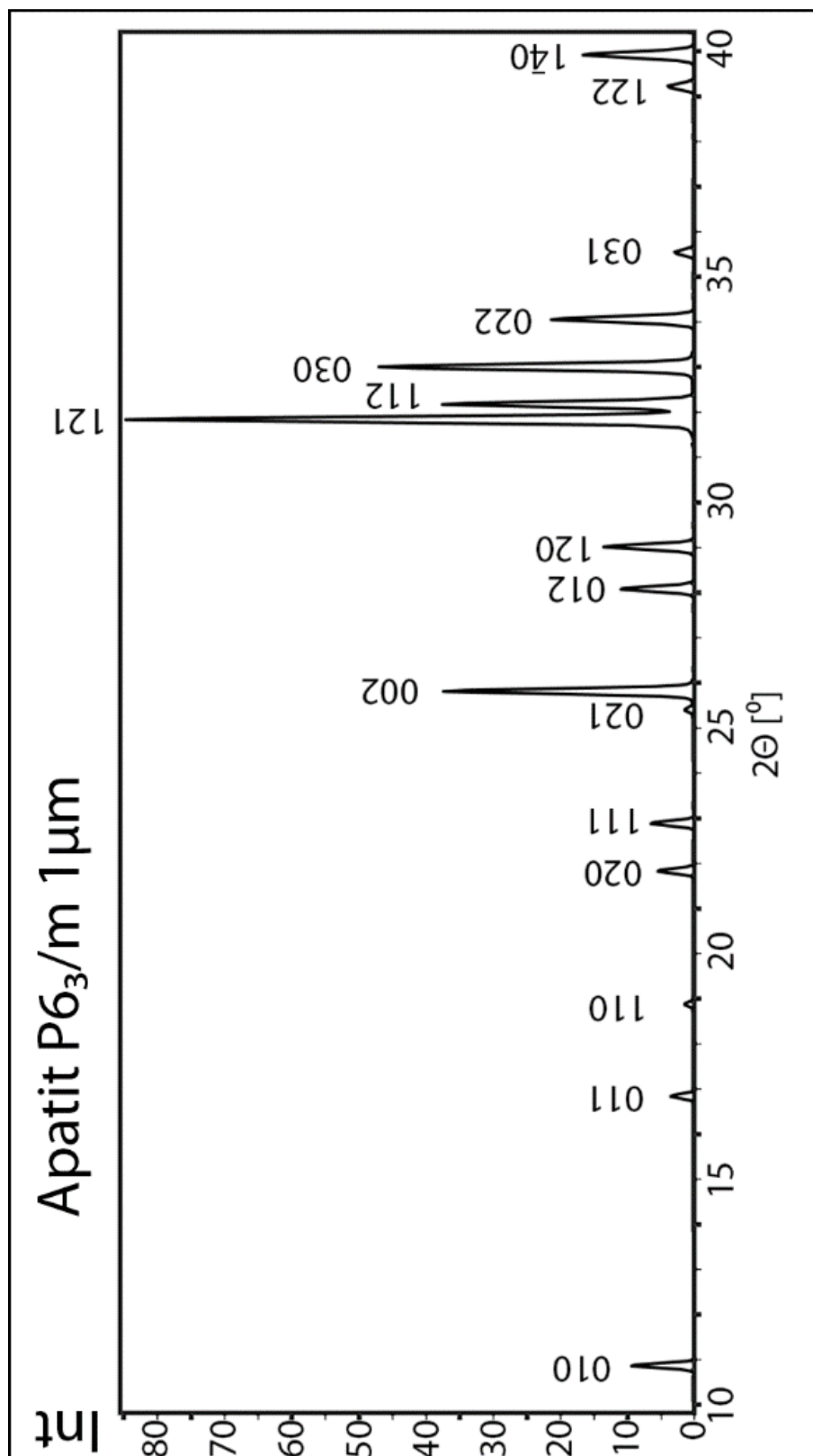
Ezekbe a tércsoportokba sorolható az eddig meghatározott apatit szerkezetek 87%-a. A szimmetriacsökkenés leggyakoribb okai a kémia helyettesítés, vakancia, vagy ezek együttes jelenléte a szerkezetben.

A röntgen-pordiffrakciós szimulációk elkészítéséhez az alábbi paramétereket kell figyelembe vennünk:

- sugárforrás: Cu $K\alpha_1$ ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$),
- csúcsprofil: pseudo-Voigt függvény (eta: 0,2),
- csúcskiszélesedés: $0,1^\circ 2\theta$
- modellezett krisztallitméret: $1\mu\text{m}$, izometrikus kristályalakkal, kitüntetett orientáció nélkül.

A krisztallitméret csökkenése okozta csúcskiszélesedését is modelleztem, ehhez 7, 10, 20 és 30 nm átmérőjű krisztallitokra számoltam diffrakciós adatkészletet. A pordiffrakciós szimulációk segítségével a szerkezeti és méretbeli különbségek meghatározására kerestünk megoldást nanokristályos apatitokon.

Ideális esetben az apatit szerkezet $P6_3/m$ tércsoportban írható le, ilyen például a FAp (30. ábra). $P6_3/m$ esetén a legintenzívebb reflexióként (relatív intenzitás 100%) az 121 és 211 reflexiók jelennek meg, $2,81 \text{ \AA}$ -nél. A nagy intenzitású reflexiók közül a legtöbb a $25\text{-}40^\circ 2\theta$ szögtartományban van. A 6_3 csavartengely miatt a $00l=2n+1$ reflexiók kioltásban vannak, így csak a 002 reflexió jelenik meg.



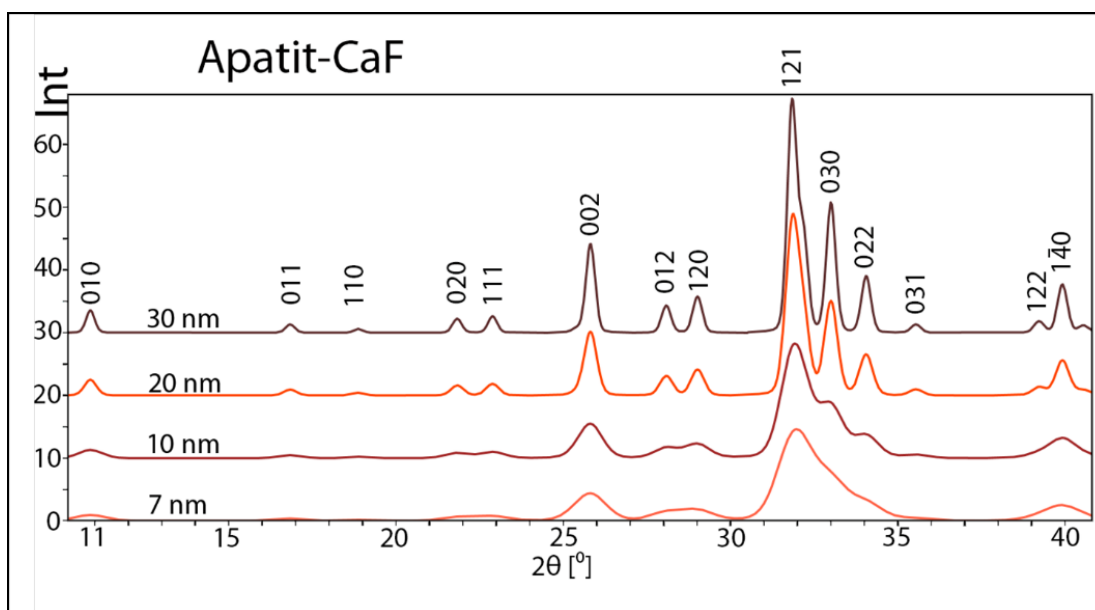
29. ábra FAp ($P6_3/m$) szimulált XRPD görbéje, $1\mu m$ kristallit méret esetén

A 011, 110, 020, 111, 021, 031 és 122 reflexiók kis intenzitásúak, így ha a mérés háttérrel, kitüntetett orientációval terhelt – illetve a krisztallitméret pár tíz *nm* –, ezek a reflexiók nem, vagy alig mérhetőek. Így az igen hasonló szerkezetek elkülönítése, laboratóriumi röntgen-pordiffrakciós mérések alapján nem lehetséges.

Viszont a röntgen-pordiffrakciós szimulációk a méretváltozás szerinti kiszélesedés modellezésére alkalmasak (31. ábra). A méretváltozás alapja a megjelenő reflexiók csúcskiszélesedése, amit a Scherrer-egyenlet ír le [84]. A krisztallitméret csökkenése okozta csúcskiszélesedést modelleztem, ehhez 7, 10, 20 és 30 *nm* átmérőjű krisztallitokból számoltam diffrakciós adatkészletet. A pordiffrakciós szimulációk segítségével a méretbeli különbségek meghatározására kerestünk megoldást nanokristályos apatitokon.

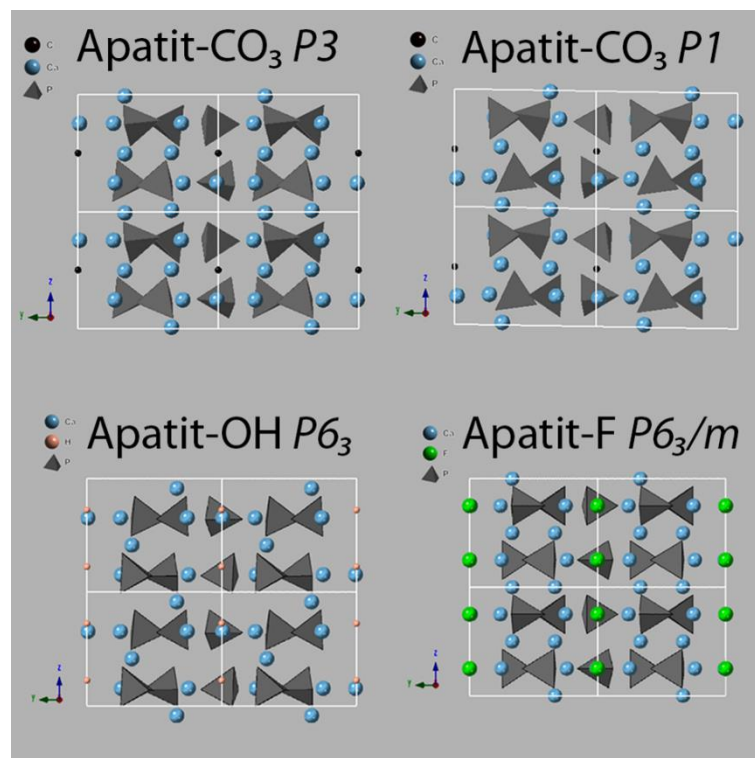
A 31. ábrán látható, hogy a 20 *nm*-nél kisebb krisztallitok esetén az 121, 030, és 022 csúcsok átfednek egymással, egyetlen széles csúcsként jelennek meg. A 010 reflexió szintén széles, és kis intenzitással van jelen, 7 *nm*-es krisztallitméretnél már csak mint háttéremelkedés jelenik meg. A 002 reflexió jól azonosítható 7-10 *nm*-es krisztallitméretnél is.

A csontokról készült kísérleti XRPD felvételekkel összehasonlítva a következő megállapításokat tehetjük: a bioapatitok nem izometrikusak, *c*-tengely szerint megnyúltak, táblás-tűs krisztallitok vannak. A bioapatit kristályok mérete ebben az irányban 30-40 *nm*, míg más irányokba 20 *nm* alatti méret feltételezhető. Fontos különbség a csontok szerves anyag (főként kollagén) tartalma okozta diffúz szórás, ami a kis intenzitással megjelenő apatitreflexiókat elfedi. Tehát, az XRPD felvételeken megjelenő reflexiók a bioapatit-szerkezet meghatározása nem, viszont krisztallitméret számolásra alkalmasak.



30. ábra *FAp* XRPD méret szerinti szimulációja.

A 10. táblázatban felsorolt szerkezetekből elektron egykristály diffrakciós felvételeket szimuláltunk. Egykristály diffrakciós felvételen a reflexiók a valós rács reciprokrácsaként jelennek meg, intenzitásukat és pozíciójukat ideális esetben a struktúrfaktor írja le. Ha a (számított) SAED felvétel orientáltan, meghatározott kristálytani $[uvw]$ irány felől készül, azon 2D reciprokrács jelenik meg. Szerkezetmeghatározás során azokat a vetületeket keressük, amelyekben a rácsra jellemző szimmetriák láthatóvá válnak. $P6_3/m$, $P6_3$ és $P3$ tércsoportoknál a c -tengellyel párhuzamos szimmetriákat jelezhető a szerkezet, így erre merőleges vetület választása célszerű, ha a tércsoportok szerinti különbségeket szeretnénk vizsgálni. Ezért választottuk a $[100]$ és $[210]$ vetületeket (32-35. bára).

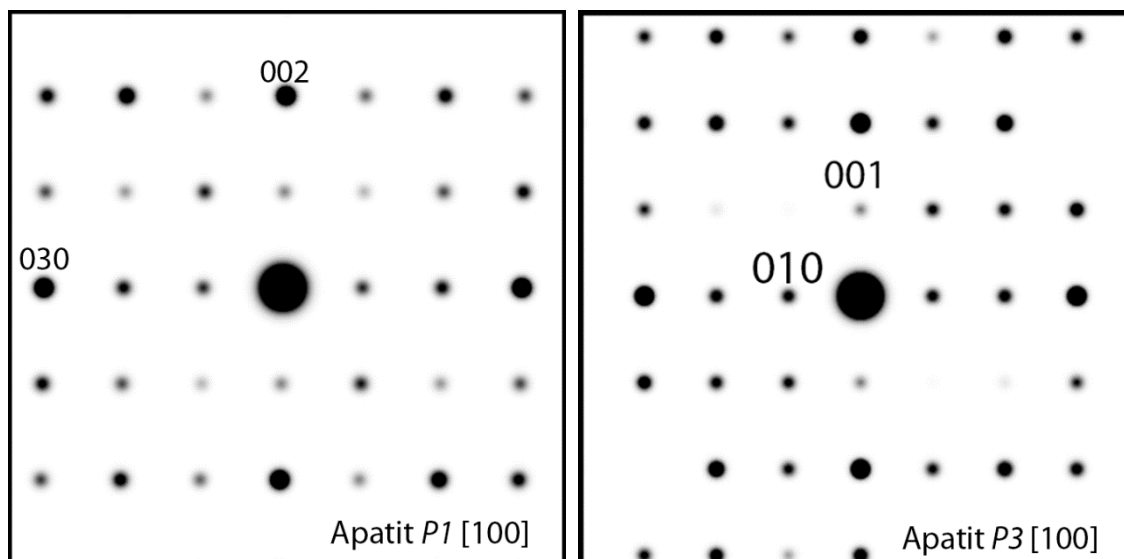


31. ábra

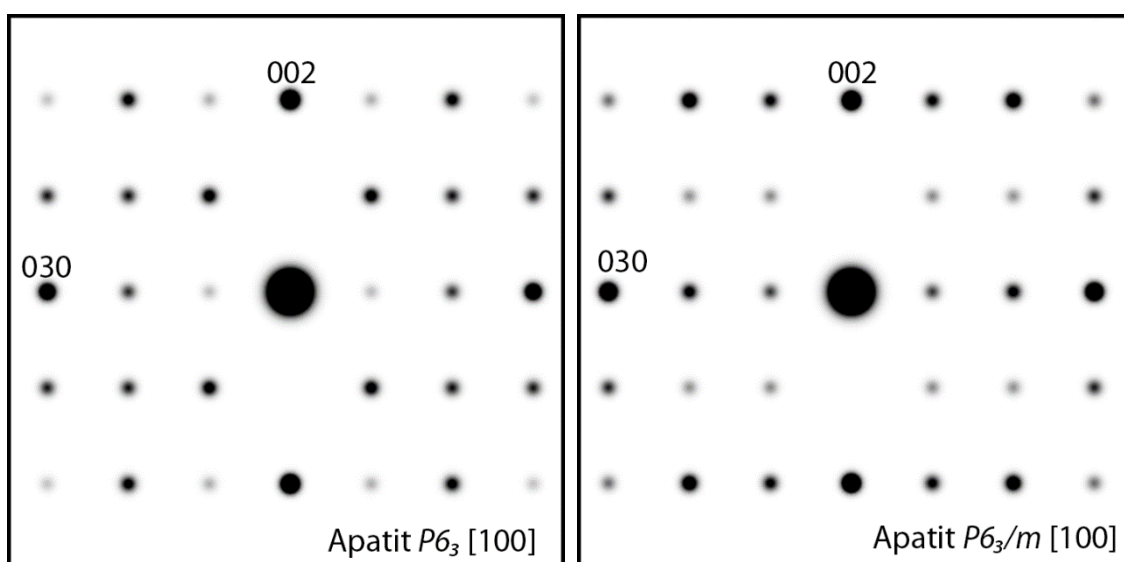
[100] vetületben A c -tengely mentén látható a hcp szerinti ABAB rendeződés, $P6_3/m$ -nél a tükörsík megléte $00\frac{1}{2}$ -nél, illetve a b -tengely (32. ábra). A két látható tengely közt derékszög van, kivétel a $P1$ tércsoportot, ahol $\alpha = 89.28^\circ$. Ezek a szögértékek a diffrakciós adatkészletben is megmaradnak (33. ábra).

A szerkezeten kívül a kémiai összetételben is van különbség, ami a szimulált diffrakciókon a reflexiók intenzitásértékében jelennek meg. Ennek oka könnyen belátható, hiszen a reflexiók intenzitását a struktúrfaktor írja le, ami az atomi szórástényezők összege, így rendszámfüggő.

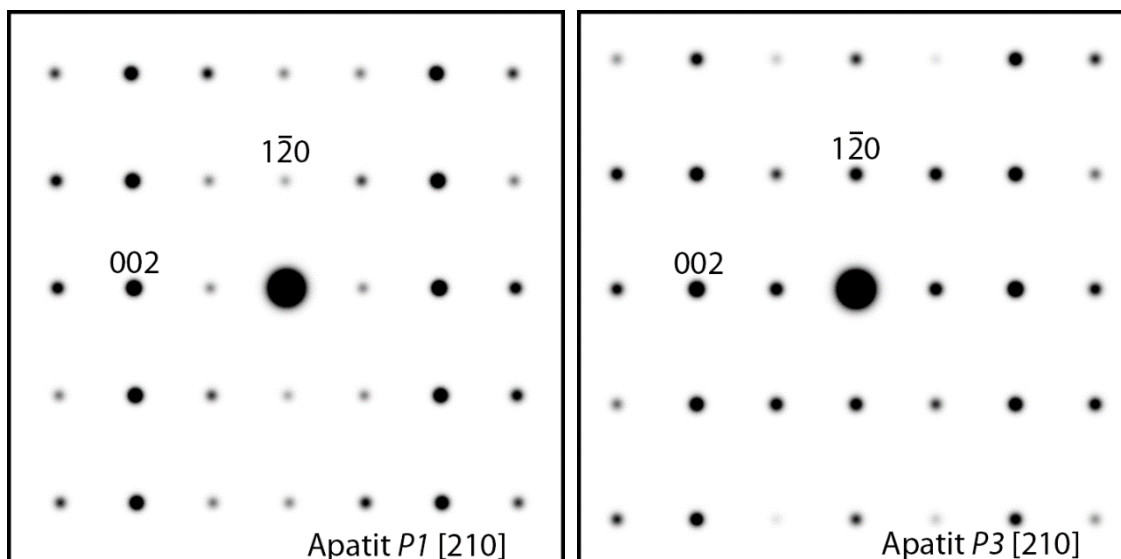
A csontokról készült kísérleti SAED felvételekkel összehasonlítva látható, hogy a csontokban sok kristály diffrakciójának az átlaga látszik, gyűrűs diffrakciót eredményezve. Ez alapján a szerkezet nem vizsgálható, a megnyúlt krisztallit alakja viszont igen. A kísérleti SAED felvételek tartalma megerősíti az XRPD felvételeken tapasztalt c -tengely szerinti megnyúlást.



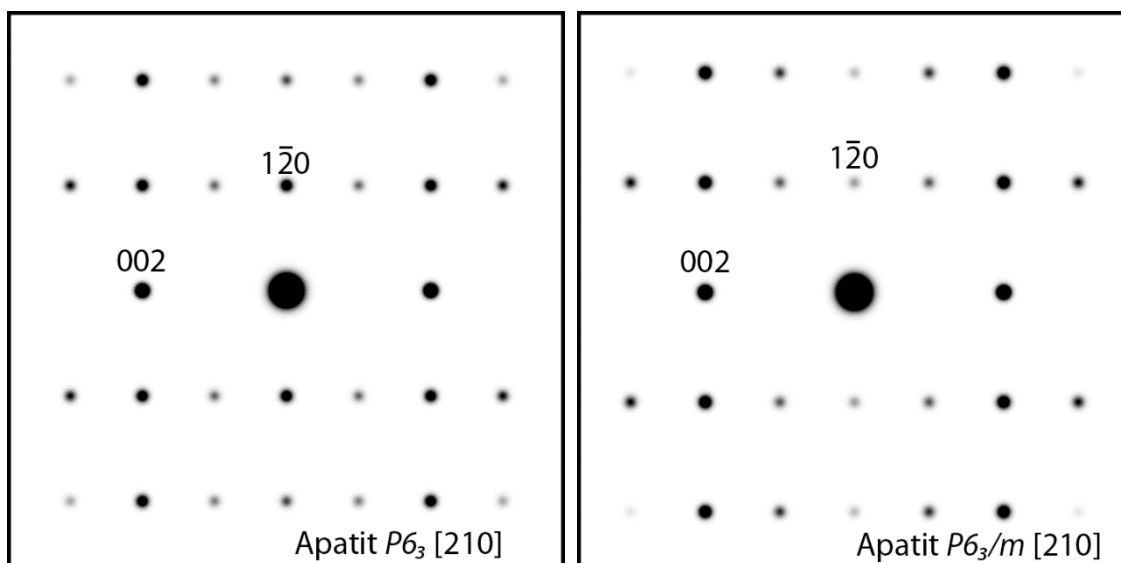
32. ábra $P1$ és $P3$ tércsoportú apatit- CO_3 [100] vetülete. A szimulált felvételeken a reflexiók intenzitás-változása jól látható. A $P1$ szerkezet mérhető $\alpha = 89,28^\circ$



33. ábra $P6_3$ és $P6_3/m$ tércsoportú apatitok [100] vetülete.



34. ábra P1 és P3 tércsoportú apatit- CO_3 [210] vetülete



35. ábra P₆₃ és P₆₃/m tércsoportú apatitok [210] vetülete.

A szerkezet szimulációk során vizsgált különböző apatit szerkezetekről a következő megállapításokat tehetjük:

1. XRPD és SAED szimulációkat készítettünk 4 különböző szerkezetű apatitról. Ezek alapján a méretmeghatározás az XRPD, míg a szerkezeti meghatározás a SAED szimulációk segítségével finomítható.
2. A csontokról készült kísérleti felvételekkel összehasonlítva különbség látszik a krisztallitok alakjában, a bioapatit *c*-tengely szerinti megnyúlásában. Az XRPD felvételek alapján viszont a pontos tércsoport meghatározása nem lehetséges.
3. A SAED kísérleti felvételeken gyűrűs diffrakciós reflexiók jelennek meg, ami sok kristály diffrakciós átlaga, így a szimulált egykristály SAED alapján közvetlen szerkezethatározás nem lehetséges.
4. A szimulált SAED felvételeken azonban megjeleníthető az apatit szerkezeti módosulatok közötti különbségek, az extra reflexiók megjelenésében és a reflexiók intenzitásarány változásában.

Összefoglalás – tézisek formájában

Dolgozatomban különböző csontok (egészséges és daganatos, emberi és állati) kristálytani vizsgálatait végeztem.

Régészeti daganatos betegségben átalakult csontokban található bioapatit vizsgálata elektrondiffrakciós és nagyfelbontású elektronmikroszkópiai technikákkal.

1. A kehida-fővenyesi mintában vizsgált bioapatit méretében nagyobb, a kaposvári mintában vizsgált bioapatit méretében kisebb, mint az egészséges csontokban mért bioapatit. Az eddigi szakirodalomban, a kehida-fővenyesi mintában tapasztalt méretnövekedés nem volt ismert, vizsgálata mindenképpen új tudományos ismeretekkel jár.
2. Kémiai összetételükben igen hasonlóak, átlagban 2.05 és 2.00 Ca/P arány mérhető, ami szintén eltérő az egészséges csontban található 1.53-1.67 Ca/P aránytól. Ezek az értékek magas CO_3^{2-} tartalom miatt lehetségesek. A CO_3^{2-} mindkét mintában a PO_4^{3-} -t helyettesíti.
3. Az elemhelyettesítés szimmetriacsökkenéssel jár. A kehida-fővenyesi mintában vizsgált bioapatit tércsoportja nem magasabb $P\bar{3}$ vagy $P\bar{6}$ -nál. Ennek oka, hogy $00l=2n$ kioltási szabály sérül, a 001 reflexiók mérhetőek.

Marhacsont tömény karbonátos oldatban áztatása, röntgen-pordiffrakciós és transzmissziós elektronmikroszkópiai vizsgálata

1. Látható, hogy a PO_4^{3-} - CO_3^{2-} átalakulás nem szilárd fázisú átalakulásként, hanem, hasonlóan a karbonát-foszfát átalakuláshoz [68], oldódás-kicsapódásként megy végbe. A PO_4^{3-} - CO_3^{2-} átalakulást eddig nem tartották lehetségesnek, a CO_3^{2-} - PO_4^{3-} átalakulást irreverzibilisnek tekintették.
2. A bioapatit CO_3^{2-} telített vizes oldatban a kísérleti eredmények alapján a lejátszódó PO_4^{3-} - CO_3^{2-} átalakulási folyamatot a következő lépésekre bonthatjuk:
 - I. elemhelyettesítés növekedése
 - II. az apatitszerkezet felbomlása
 - III. karbonátképződés.

3. A megnövekedett CO_3^{2-} helyettesítés következtében a bioapatit oldhatósága nőtt. A bioapatit oldásából felszabadult Ca karbonátként kikristályosodott, míg a foszfát – változatlan pH mellett - oldatban maradt, „kilúgozódott”.

Marhacsont hevítése és röntgen-pordiffrakciós és transzmissziós elektronmikroszkópiai vizsgálata

1. A hevítés hatására a csontban található bioapatit, a szerves anyag elégését követően, apatittá alakul. Ez az átalakulás 600 °C-ig megtörténik. A hevítés során a csont kezdő tömegének közel 30%-át elveszti.
2. További hevítés során az apatitszerkezetben található CO_3^{2-} helyettesítés is eltűnik, a szerkezet változik. A szerkezeti átalakulás – TEM kísérletek tapasztalata alapján megerősítve – szublimáció-precipitációs folyamatként zajlik le.
3. A hevítés során a krisztallitok mérete 600 °C-ig nem változik, alakra izometrikus 30-40 nm-es gömbök formálódnak. 600 °C felett megindul a krisztallitok méretnövekedése, ami a hőmérséklet értékével arányos változás.
4. A hevítés során az apatit kristályok szerkezete is változik. Erre bizonyíték, hogy a FFT-n 700 °C felett megjelennek a $00l=2n+1$ reflexiók, amik a $P6_3/m$ tércsoport csökkenésére mutatnak.
5. 1100 °C-on a krisztallitok méret szerint differenciálódnak, ami előjele lehet a szerkezet felbomlásának.

Szimulációs eredmények

1. XRPD és SAED szimulációkat készítettünk 4 különböző szerkezetű apatitról. Ezek alapján a méretmeghatározás az XRPD, míg a szerkezeti meghatározás a SAED szimulációk segítségével finomítható.
2. A csontokról készült kísérleti felvételekkel összehasonlítva különbség látszik a krisztallitok alakjában, a bioapatit c-tengely szerinti megnyúlásában. Az XRPD felvételek alapján viszont a pontos tércsoport meghatározása nem lehetséges.
3. A SAED kísérleti felvételeken gyűrűs diffrakciós reflexiók jelennek meg, ami sok kristály diffrakciós átlaga, így a szimulált egykristály SAED alapján közvetlen szerkezethatározás nem lehetséges.

Köszönetnyilvánítás

Elsőként köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, **Dódony Istvánnak** a témaválasztásért és a BSc szakdolgozatomtól tartó közös munkáért. Köszönöm neki a számtalan emberi és szakmai tanácsot, a konzultációkat és a türelmét.

Hálával tartozom **Kovácsné Kis Viktóriának** a transzmissziós elektronmikroszkópos mérésekben való segítségéért. **Kristály Ferencnek** kiemelt köszönet jár a röntgendiffrakciós mérésekért, a dolgozat átolvasásáért és véleményezéséért, valamint a sok segítségért, amit az adatok értékelésénél nyújtott.

Hálával tartozom **Hajdu Tamásnak** és **Szeniczey Tamásnak** a régészeti korú csontleletek antropológiai vizsgálatáért, biztatásukért és a közös munkánkért.

Köszönöm a **MTA MFA Vékonyréteg-fizika Laboratórium munkatársainak**, a **Miskolci Egyetem Ásvány-Kőzettani Tanszék dolgozóinak**, valamint nem utolsósorban az **ELTE Ásványtani Tanszék munkatársainak**, hogy az elmúlt 4 évben segítettek. Külön köszönet egykori évfolyamtársaimnak, **Kovács Zoltánnak** és **Tóth Ágostonnak**, akik végigkísértek és barátságukkal támogattak az évek során.

A **Kőrösi Csoma Sándor Kollégium egykori nevelő tanárainak** külön köszönet jár, hogy befogadtak és soha nem múló jókedvükkel támogattak.

Köszönöm az **ELTE Tehetséggondozási Tanácsának**, a multidiszciplináris pályázatán elnyert támogatását, illetve a **Pázmány-Eötvös Természettudományi Információs Alapítvány** anyagi támogatását.

Hálás vagyok a **Családomnak**, akiknek a támogatására születésem óta számíthatok.

Tartalmi kivonat

A csontok vizsgálata határterülete a biológiának, ásványtannak, geológiának, anyagtudománynak és orvostudománynak egyaránt. Számos kutatási irány köthető több fontos, a csontokhoz kapcsolódó témakörben. Biológiában a csontképződés folyamatának a megértése, geológiában a fosszilizáció folyamata, anyagtudományban a csontpótló anyagok fejlesztése, orvostudomány területén pedig a csontbetegségek megismerése. Krisztallográfiai szempontból a csontok szervesetlen alkotórészének a jellemzése, szerkezetmeghatározása a legnagyobb kihívás. Dolgozatomban különböző régészeti és recens, emberi és állati, egészséges és beteg csontokon végeztem ásványtani vizsgálatokat.

A csontok ásványtani vizsgálatára, krisztallográfiai jellemzésére minden érintett tudományterület nagy érdeklődéssel vár. Mára elérhetővé váltak a szubmikrométeres felbontással történő vizsgálati módszerek, melyek közül az XRPD és a TEM élenjáró. Az XRPD és a TEM egymást kiegészítő módszerek, melyek kombinációja igen hatékonyan alkalmazható szerkezetvizsgálatban.

Dolgozatomban csontmintákat vizsgáltam, a vizsgálataim három csoportra bonthatóak:

1. régészeti emberi csontleletek vizsgálata
2. áztatásos kísérlet marhacsonton és
3. hőkezeléses kísérlet marhacsonton. A régészeti csontleletek között különböző korokból egészséges és beteg csontokat egyaránt vizsgáltam.

Az áztatásos kísérlet során karbonátos vízben áztattam marhacsontport, változtatva az áztatás idejét és a csontpor mennyiségét. Hőkezelés során 1100 °C-ig hevítettem marhacsontport.

A kísérleti felvételeket értékelés során szimulált diffrakciós felvételekkel vettem össze. A kísérleti munkámhoz kapcsolódó témaköröket a következő koncepciók alapján tárgyalom:

Milyen ásványok jellemzik az egészséges és a beteg csontokat?

Hogyan mérem azokat? Mi a különbség a bioapatitok között?

Szimulációt készítettem $P1$, $P3$, $P6_3$ és $P6_3/m$ tércsoportú apatit szerkezetéről. A tércsoport mellett a kémiai helyettesítés – CO_3^{2-} – okozta változásokat is vizsgáltam.

Abstract

The major inorganic constituent of bone is a calcium phosphate mineral that is similar in composition and structure to minerals within the apatite group. Every mineral is characterized by a unique combination of compositional and structural parameters. In structural crystallography electron and X-ray diffraction techniques have priority for characterizing both the crystal structure and chemical composition.

The crystal size, heterogeneity and chemical substitutions are all of the main limiting factors in diffraction techniques applicability. Now it is possible to apply these techniques combined with simulated diffraction patterns.

In my thesis I characterized the crystal structure of bioapatites. The topic of the first two parts are a literary background to evolution of bioapatite research. I gave also a short background of the process of the crystallographical characterization then I applied it in the practice. I worked with the ancient diseased human bones from Kehidafövényes and Kaposvár using transmission electron microscopy (TEM) and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS). I made a leaching and a heating experiments on bovine tibia. To the characterization I also used TEM and EDS, combined with X-ray powder diffraction.

In the third and last part I applied the Bragg-equation for diffraction pattern simulations. I used these simulations for differentiation between apatite modifications.

Hivatkozott irodalom

- [1] B. Wopenka és J. D. Pasteris, „A mineralogical perspective on the apatite in bone”, *Mater. Sci. Eng. C*, köt. 25, sz. 2, o. 131–143, ápr. 2005, doi: 10.1016/j.msec.2005.01.008.
- [2] M. Rohde és H. Mayer, „Exocytotic Process as a Novel Model for Mineralization by Osteoblasts In Vitro and In Vivo Determined by Electron Microscopic Analysis”, *Calcif. Tissue Int.*, köt. 80, sz. 5, o. 323–336, jún. 2007, doi: 10.1007/s00223-007-9013-5.
- [3] F.-Z. Cui, Y. Li, és J. Ge, „Self-assembly of mineralized collagen composites”, *Mater. Sci. Eng. R Rep.*, köt. 57, sz. 1–6, o. 1–27, aug. 2007, doi: 10.1016/j.mser.2007.04.001.
- [4] B. Alexander és mtsai., „The nanometre-scale physiology of bone: steric modelling and scanning transmission electron microscopy of collagen-mineral structure”, *J. R. Soc. Interface*, köt. 9, sz. 73, o. 1774–1786, aug. 2012, doi: 10.1098/rsif.2011.0880.
- [5] R. A. Harper és A. S. Posner, „Measurement of Non-Crystalline Calcium Phosphate in Bone Mineral.”, *Exp. Biol. Med.*, köt. 122, sz. 1, o. 137–142, máj. 1966, doi: 10.3181/00379727-122-31073.
- [6] A. S. Posner, R. A. Harper, S. A. Muller, és J. Menczel, „AGE CHANGES IN THE CRYSTAL CHEMISTRY OF BONE APATITE”, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, köt. 131, sz. 2 Mechanisms of, o. 737–742, szept. 1965, doi: 10.1111/j.1749-6632.1965.tb34837.x.
- [7] J. D. Termine és A. S. Posner, „Infra-Red Determination of the Percentage of Crystallinity in Apatitic Calcium Phosphates”, *Nature*, köt. 211, sz. 5046, o. 268–270, júl. 1966, doi: 10.1038/211268a0.
- [8] J. D. Termine és A. S. Posner, „Amorphous/crystalline interrelationships in bone mineral”, *Calcif. Tissue Res.*, köt. 1, sz. 1, o. 8–23, dec. 1967, doi: 10.1007/BF02008070.
- [9] A. L. Boskey és A. S. Posner, „Conversion of amorphous calcium phosphate to microcrystalline hydroxyapatite. A pH-dependent, solution-mediated, solid-solid conversion”, *J. Phys. Chem.*, köt. 77, sz. 19, o. 2313–2317, szept. 1973, doi: 10.1021/j100638a011.
- [10] A. L. Boskey, „Amorphous Calcium Phosphate: The Contention of Bone”, *J. Dent. Res.*, köt. 76, sz. 8, o. 1433–1436, aug. 1997, doi: 10.1177/00220345970760080501.
- [11] A. S. Posner és F. Betts, „Synthetic amorphous calcium phosphate and its relation to bone mineral structure”, *Acc. Chem. Res.*, köt. 8, sz. 8, o. 273–281, aug. 1975, doi: 10.1021/ar50092a003.
- [12] K. Sudarsanan, P. E. Mackie, és R. A. Young, „Comparison of synthetic and mineral fluorapatite, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$, in crystallographic detail”, *Mater. Res. Bull.*, köt. 7, sz. 11, o. 1331–1337, nov. 1972, doi: 10.1016/0025-5408(72)90113-4.
- [13] K. Sudarsanan, R. A. Young, és A. J. C. Wilson, „The structures of some cadmium ‘apatites’ $\text{Cd}_5(\text{MO}_4)_3\text{X}$. I. Determination of the structures of $\text{Cd}_5(\text{VO}_4)_3\text{I}$, $\text{Cd}_5(\text{PO}_4)_3\text{Br}$, $\text{Cd}_3(\text{AsO}_4)_3\text{Br}$ and $\text{Cd}_5(\text{VO}_4)_3\text{Br}$ ”, *Acta Crystallogr. B*, köt. 33, sz. 10, o. 3136–3142, okt. 1977, doi: 10.1107/S0567740877010413.
- [14] K. Sudarsanan és R. A. Young, „Structural interactions of F, Cl and OH in apatites”, *Acta Crystallogr. B*, köt. 34, sz. 5, o. 1401–1407, máj. 1978, doi: 10.1107/S0567740878005798.

- [15] P. E. Mackie és R. A. Young, „Fluorine-chlorine interaction in fluor-chlorapatite”, *J. Solid State Chem.*, köt. 11, sz. 4, o. 319–329, dec. 1974, doi: 10.1016/S0022-4596(74)80037-X.
- [16] F. Betts és A. S. Posner, „An X-ray radial distribution study of amorphous calcium phosphate”, *Mater. Res. Bull.*, köt. 9, sz. 3, o. 353–360, márc. 1974, doi: 10.1016/0025-5408(74)90087-7.
- [17] N. C. Blumenthal, F. Betts, és A. S. Posner, „Stabilization of amorphous calcium phosphate by Mg and ATP”, *Calcif. Tissue Res.*, köt. 23, sz. 3, o. 245–250, okt. 1977.
- [18] M. J. Glimcher, „Bone: Nature of the Calcium Phosphate Crystals and Cellular, Structural, and Physical Chemical Mechanisms in Their Formation”, *Rev. Mineral. Geochem.*, köt. 64, sz. 1, o. 223–282, jan. 2006, doi: 10.2138/rmg.2006.64.8.
- [19] A. L. Boskey, „Mineralization of Bones and Teeth”, *Elements*, köt. 3, sz. 6, o. 385–391, dec. 2007, doi: 10.2113/GSELEMENTS.3.6.385.
- [20] Y. Dauphin és C. T. Williams, „The chemical compositions of dentine and enamel from recent reptile and mammal teeth—variability in the diagenetic changes of fossil teeth”, *CrystEngComm*, köt. 9, sz. 12, o. 1252, 2007, doi: 10.1039/b708985f.
- [21] I. Reiche, C. Vignaud, és M. Menu, „The crystallinity of ancient bone and dentine: new insights by transmission electron microscopy”, *Archaeometry*, köt. 44, sz. 3, o. 447–459, aug. 2002, doi: 10.1111/1475-4754.00077.
- [22] M. Wakasa és mtsai., „Fine structure of tooth enamel in the yellowing human teeth: SEM and HRTEM studies: FINE STRUCTURE OF YELLOWING HUMAN TEETH”, *Microsc. Res. Tech.*, köt. 79, sz. 1, o. 14–22, jan. 2016, doi: 10.1002/jemt.22600.
- [23] K. D. Rogers és P. Zioupos, „The bone tissue of the rostrum of a Mesoplodon Densirostris whale: a mammalian biomineral demonstrating extreme texture”, *J. Mater. Sci. Lett.*, köt. 18, sz. 8, o. 651–654, 1999, doi: 10.1023/A:1006615422214.
- [24] J. C. Elliott, „Calcium Phosphate Biominerals”, *Rev. Mineral. Geochem.*, köt. 48, sz. 1, o. 427–453, jan. 2002, doi: 10.2138/rmg.2002.48.11.
- [25] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, H. Sfihi, és A. Barroug, „Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials”, *Mater. Sci. Eng. C*, köt. 27, sz. 2, o. 198–205, márc. 2007, doi: 10.1016/j.msec.2006.05.015.
- [26] Z. Li és J. D. Pasteris, „Chemistry of bone mineral, based on the hypermineralized rostrum of the beaked whale Mesoplodon densirostris”, *Am. Mineral.*, köt. 99, sz. 4, o. 645–653, ápr. 2014, doi: 10.2138/am.2014.4571.
- [27] V. K. Kis, Z. Czigány, Z. Dallos, D. Nagy, és I. Dódon, „HRTEM study of individual bone apatite nanocrystals reveals symmetry reduction with respect to P63/m apatite”, *Mater. Sci. Eng. C*, köt. 104, o. 109966, nov. 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.109966.
- [28] R. Z. LeGeros és M. S. Tung, „Chemical Stability of Carbonate- and Fluoride-Containing Apatites”, *Caries Res.*, köt. 17, sz. 5, o. 419–429, 1983, doi: 10.1159/000260696.
- [29] Z. Dallos, „Csontleletek ásványtani vizsgálata és az apatit kristálykémiája röntgen pordiffrakciós módszerekkel”, MSc, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Földrajz-Földtudományi Intézet, 2015.

- [30] H. R. Wenk és F. Heidelbach, „Crystal alignment of carbonated apatite in bone and calcified tendon: results from quantitative texture analysis”, *Bone*, köt. 24, sz. 4, o. 361–369, ápr. 1999.
- [31] N. Reznikov, M. Bilton, L. Lari, M. M. Stevens, és R. Kröger, „Fractal-like hierarchical organization of bone begins at the nanoscale”, *Science*, köt. 360, sz. 6388, o. eaao2189, máj. 2018, doi: 10.1126/science.aao2189.
- [32] E. Burke, „Tidying up Mineral Names: an IMA-CNMNC Scheme for Suffixes, Hyphens and Diacritical marks”, *Mineral. Rec.*, köt. 39, o. 131–135, 2008.
- [33] I. Náray-Szabó, „27. The structure of apatite (CaF)Ca₄(PO₄)₃”, *Z. Für Krist. - Cryst. Mater.*, köt. 75, sz. 1, jan. 1930, doi: 10.1515/zkri-1930-0129.
- [34] M. Mehmel, „21 Über die Struktur des Apatits. I.”, *Z. Für Krist. - Cryst. Mater.*, köt. 75, sz. 1, jan. 1930, doi: 10.1515/zkri-1930-0122.
- [35] J. M. Hughes, M. Cameron, és K. D. Crowley, „Structural variations in natural F, OH, and Cl apatites”, *Am. Mineral.*, köt. 74, sz. 7–8, o. 870–876, aug. 1989.
- [36] T. White, „Apatite - An Adaptive Framework Structure”, *Rev. Mineral. Geochem.*, köt. 57, sz. 1, o. 307–401, jan. 2005, doi: 10.2138/rmg.2005.57.10.
- [37] T. Zagyva, „A Bioapatit és az apatit szupercsoport ásványainak szerkezeti jellemzése”, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Földrajz-Földtudományi Intézet, 2016.
- [38] T. J. White és D. ZhiLi, „Structural derivation and crystal chemistry of apatites”, *Acta Crystallogr. B*, köt. 59, sz. 1, o. 1–16, febr. 2003, doi: 10.1107/S0108768102019894.
- [39] D. McConnell, „The Crystal Chemistry of Carbonate Apatites and their Relationship to the Composition of Calcified Tissues”, *J. Dent. Res.*, köt. 31, sz. 1, o. 53–63, jan. 1952, doi: 10.1177/00220345520310012301.
- [40] R. Z. Legeros, O. R. Trautz, J. P. Legeros, E. Klein, és W. P. Shirra, „Apatite Crystallites: Effects of Carbonate on Morphology”, *Science*, köt. 155, sz. 3768, o. 1409–1411, márc. 1967, doi: 10.1126/science.155.3768.1409.
- [41] T. Baikie és mtsai., „Crystal chemistry of mimetite, Pb₁₀(AsO₄)₆Cl_{1.48}O_{0.26}, and finnemanite, Pb₁₀(AsO₃)₆Cl₂”, *Acta Crystallogr. B*, köt. 64, sz. 1, o. 34–41, febr. 2008, doi: 10.1107/S0108768107066402.
- [42] D. F. Williams és European Society for Biomaterials., „Definitions in biomaterials : proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986”, Amsterdam; New York, 1987.
- [43] D. Shi, Szerk., *Introduction to biomaterials*. Beijing, China : Singapore ; Hackensack, NJ: Tsinghua University Press ; World Scientific, 2006.
- [44] J. D. Pasteris, „A mineralogical view of apatitic biomaterials”, *Am. Mineral.*, köt. 101, sz. 12, o. 2594–2610, dec. 2016, doi: 10.2138/am-2016-5732.
- [45] G. Daculsi, R. Z. LeGeros, M. Heughebaert, és I. Barbieux, „Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics”, *Calcif. Tissue Int.*, köt. 46, sz. 1, o. 20–27, jan. 1990, doi: 10.1007/BF02555820.

- [46] B. Basu és S. Nath, „Fundamentals of Biomaterials and Biocompatibility”, in *Advanced Biomaterials*, B. Basu, D. S. Katti, és A. Kumar, Szerk. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010, o. 1–18.
- [47] R. B. Heimann, „Structure, properties, and biomedical performance of osteoconductive bioceramic coatings”, *Surf. Coat. Technol.*, köt. 233, o. 27–38, okt. 2013, doi: 10.1016/j.surfcoat.2012.11.013.
- [48] R. Z. LeGeros, S. Lin, R. Rohanizadeh, D. Mijares, és J. P. LeGeros, „Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, köt. 14, sz. 3, o. 201–209, márc. 2003, doi: 10.1023/a:1022872421333.
- [49] M. S. Sader, R. Z. Legeros, és G. A. Soares, „Human osteoblasts adhesion and proliferation on magnesium-substituted tricalcium phosphate dense tablets”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, köt. 20, sz. 2, o. 521–527, febr. 2009, doi: 10.1007/s10856-008-3610-3.
- [50] J. H. Shepherd és S. M. Best, „Calcium phosphate scaffolds for bone repair”, *JOM*, köt. 63, sz. 4, o. 83–92, ápr. 2011, doi: 10.1007/s11837-011-0063-9.
- [51] H. P. Schwarcz, „The ultrastructure of bone as revealed in electron microscopy of ion-milled sections”, *Semin. Cell Dev. Biol.*, köt. 46, o. 44–50, okt. 2015, doi: 10.1016/j.semcdb.2015.06.008.
- [52] J. D. Currey, „MATERIALS SCIENCE: Hierarchies in Biomineral Structures”, *Science*, köt. 309, sz. 5732, o. 253–254, júl. 2005, doi: 10.1126/science.1113954.
- [53] C. Ferraris, T. J. White, J. Plévert, és R. Wegner, „Nanometric modulation in apatite”, *Phys. Chem. Miner.*, köt. 32, sz. 7, o. 485–492, nov. 2005, doi: 10.1007/s00269-005-0023-4.
- [54] C. Combes, S. Cazalbou, és C. Rey, „Apatite Biominerals”, *Minerals*, köt. 6, sz. 2, o. 34, ápr. 2016, doi: 10.3390/min6020034.
- [55] B. K. Sarma, P. Barman, B. Sarma, A. Das, és A. R. Pal, „Biomimetic deposition of carbonate apatite and role of carbonate substitution on mechanical properties at nanoscale”, *Mater. Lett.*, köt. 185, o. 387–390, dec. 2016, doi: 10.1016/j.matlet.2016.09.028.
- [56] W. H. Bragg és W. L. Bragg, „The Reflection of X-rays by Crystals”, *Proc. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.*, köt. 88, sz. 605, o. 428–438, júl. 1913, doi: 10.1098/rspa.1913.0040.
- [57] P. Debye, „Zerstreuung von Röntgenstrahlen”, *Ann. Phys.*, köt. 351, sz. 6, o. 809–823, 1915, doi: 10.1002/andp.19153510606.
- [58] R. E. Dinnebier és S. J. L. Billinge, Szerk., *Powder diffraction: theory and practice*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2008.
- [59] H. M. Rietveld, „Line profiles of neutron powder-diffraction peaks for structure refinement”, *Acta Crystallogr.*, köt. 22, sz. 1, o. 151–152, jan. 1967, doi: 10.1107/S0365110X67000234.
- [60] H. M. Rietveld, „A profile refinement method for nuclear and magnetic structures”, *J. Appl. Crystallogr.*, köt. 2, sz. 2, o. 65–71, jún. 1969, doi: 10.1107/S0021889869006558.
- [61] R. A. Young, P. E. Mackie, és R. B. von Dreele, „Application of the pattern-fitting structure-refinement method of X-ray powder diffractometer patterns”, *J. Appl. Crystallogr.*, köt. 10, sz. 4, o. 262–269, aug. 1977, doi: 10.1107/S0021889877013466.

- [62] R. A. Young, *The Rietveld method*. [Chester, England]; Oxford; New York: International Union of Crystallography ; Oxford University Press, 1993.
- [63] M. Merczi és mtsai., „Skeletal Metastatic Carcinomas from the Roman Period (1st to 5th Century AD) in Hungary”, *Pathobiology*, köt. 81, sz. 2, o. 100–111, 2014, doi: 10.1159/000357435.
- [64] E. Molnár és mtsai., „Rare Case of an Ancient Craniofacial Osteosarcoma with Probable Surgical Intervention”, *Pathol. Oncol. Res.*, köt. 23, sz. 3, o. 583–587, júl. 2017, doi: 10.1007/s12253-016-0153-7.
- [65] E. Amenta, H. E. King, H. Petermann, V. Uskoković, S. M. Tommasini, és C. M. Macica, „Vibrational spectroscopic analysis of hydroxyapatite in HYP mice and individuals with X-linked hypophosphatemia”, *Ther. Adv. Chronic Dis.*, köt. 9, sz. 12, o. 268–281, dec. 2018, doi: 10.1177/2040622318804753.
- [66] K. Kiss és mtsai., „Kehida-Fövényes 8–9. századi népességének történeti embertani vizsgálata”, *Anthropol. Közlemények*, köt. 60, o. 3–25, 2019, doi: 10.20330/AnthropKozl.2019.60.3.
- [67] C. E. Németh, Z. Bernert, Z. Gallina, M. Varga, I. Pap, és T. Hajdu, „Palaopathological investigation of an Árpadian Age series from Kaposvár road 61, Site 2.”, *Anthropol. Közlemények*, köt. 56, o. 61–90, 2015, doi: 10.20330/AnthropKozl.2015.56.61.
- [68] A. Kasioptas, T. Geisler, C. V. Putnis, C. Perdikouri, és A. Putnis, „Crystal growth of apatite by replacement of an aragonite precursor”, *J. Cryst. Growth*, köt. 312, sz. 16–17, o. 2431–2440, aug. 2010, doi: 10.1016/j.jcrysgro.2010.05.014.
- [69] S. V. Dorozhkin, „Dissolution mechanism of calcium apatites in acids: A review of literature”, *World J. Methodol.*, köt. 2, sz. 1, o. 1, 2012, doi: 10.5662/wjm.v2.i1.1.
- [70] Å. Bengtsson, „Solubility and surface complexation studies of apatites”, Department of Chemistry, Umeå University, Umeå, 2007.
- [71] Å. Bengtsson, A. Shchukarev, P. Persson, és S. Sjöberg, „Phase Transformations, Ion-Exchange, Adsorption, and Dissolution Processes in Aquatic Fluorapatite Systems”, *Langmuir*, köt. 25, sz. 4, o. 2355–2362, febr. 2009, doi: 10.1021/la803137u.
- [72] C. Drouet és mtsai., „Nanocrystalline apatites: The fundamental role of water”, *Am. Mineral.*, köt. 103, sz. 4, o. 550–564, ápr. 2018, doi: 10.2138/am-2018-6415.
- [73] M. Nakamura, R. Hiratai, T. Hentunen, J. Salonen, és K. Yamashita, „Hydroxyapatite with High Carbonate Substitutions Promotes Osteoclast Resorption through Osteocyte-like Cells”, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, köt. 2, sz. 2, o. 259–267, febr. 2016, doi: 10.1021/acsbiomaterials.5b00509.
- [74] A. Onishi, P. S. Thomas, B. H. Stuart, J. P. Guérbois, és S. L. Forbes, „TG-MS analysis of the thermal decomposition of pig bone for forensic applications”, *J. Therm. Anal. Calorim.*, köt. 92, sz. 1, o. 87–90, ápr. 2008, doi: 10.1007/s10973-007-8741-0.
- [75] A. Kohutová, P. Honcová, L. Svoboda, P. Bezdička, és M. Maříková, „Structural characterization and thermal behaviour of biological hydroxyapatite”, *J. Therm. Anal. Calorim.*, köt. 108, sz. 1, o. 163–170, ápr. 2012, doi: 10.1007/s10973-011-1942-6.

- [76] H. Chihi, I. Khattech, és M. Jemal, „Preparation, characterization and thermochemistry of magnesium carbonate co-substituted fluorapatites”, *J. Therm. Anal. Calorim.*, köt. 127, sz. 3, o. 2427–2438, márc. 2017, doi: 10.1007/s10973-016-5693-2.
- [77] W. Chen és mtsai., „Temperature-related changes of Ca and P release in synthesized hydroxylapatite, geological fluorapatite, and bone bioapatite”, *Chem. Geol.*, köt. 451, o. 183–188, febr. 2017, doi: 10.1016/j.chemgeo.2017.01.014.
- [78] J. C. Hiller, T. J. U. Thompson, M. P. Evison, A. T. Chamberlain, és T. J. Wess, „Bone mineral change during experimental heating: an X-ray scattering investigation”, *Biomaterials*, köt. 24, sz. 28, o. 5091–5097, dec. 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00427-7.
- [79] K. Haberkó és mtsai., „Natural hydroxyapatite—its behaviour during heat treatment”, *J. Eur. Ceram. Soc.*, köt. 26, sz. 4–5, o. 537–542, jan. 2006, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2005.07.033.
- [80] G. Ulian, G. valdre, M. corno, és P. Ugliengo, „Periodic ab initio bulk investigation of hydroxylapatite and type A carbonated apatite with both pseudopotential and all-electron basis sets for calcium atoms”, *Am. Mineral.*, köt. 98, sz. 2–3, o. 410–416, febr. 2013, doi: 10.2138/am.2013.4171.
- [81] M. E. Fleet és X. Liu, „Carbonate apatite type A synthesized at high pressure: new space group and orientation of channel carbonate ion”, *J. Solid State Chem.*, köt. 174, sz. 2, o. 412–417, szept. 2003, doi: 10.1016/S0022-4596(03)00281-0.
- [82] E. Mugnaioli, J. Reyes-Gasga, U. Kolb, J. Hemmerlé, és É. F. Brès, „Evidence of Noncentrosymmetry of Human Tooth Hydroxyapatite Crystals”, *Chem. - Eur. J.*, köt. 20, sz. 23, o. 6849–6852, jún. 2014, doi: 10.1002/chem.201402275.
- [83] M. E. Fleet és Y. Pan, „Site preference of rare earth elements in fluorapatite; binary (LREE+HREE)-substituted crystals”, *Am. Mineral.*, köt. 82, sz. 9–10, o. 870–877, okt. 1997, doi: 10.2138/am-1997-9-1004.
- [84] P. Scherrer, „Bestimmung der inneren Struktur und der Größe von Kolloidteilchen mittels Röntgenstrahlen”, in *Kolloidchemie Ein Lehrbuch*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1912, o. 387–409.

ADATLAP

a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához*

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: Dallos Zsolt

MTMT-azonosító: 10060248

A doktori értekezés címe és alcíme: Csontok ásványtani vizsgálata

DOI-azonosító: 10.15476/ELTE.2020.014

A doktori iskola neve: Földtudományi Doktori Iskola

A doktori iskolán belüli doktori program neve: Földtan-Geofizika

A témavezető neve és tudományos fokozata: Dódony István, DSc

A témavezető munkahelye: ELTE, Ásványtani Tanszék

II. Nyilatkozatok

1. A doktori értekezés szerzőjeként

a) hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.

Felhatalmazom a Természettudományi kar Dékáni Hivatal Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportjának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (*dátum*)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.


2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: Budapest, 2020.01.28.



.....
a doktori értekezés szerzőjének aláírása

**ELTE SZMSZ SZMR 12. sz. melléklet*